

コイカテプシンLの構造と機能に関する研究
(Studies on structure and function of carp
Cyprinus carpio cathepsin L)

2003 年 12 月

長崎大学大学院生産科学研究科

常本 和伸

コイカテプシン L の構造と機能に関する研究

目次

緒言	1
第一章 コイカテプシン L 遺伝子のクローニング	4
実験方法	5
1. 実験魚	5
2. 遺伝子組換え実験用試薬及び機器	5
3. 実験方法	5
(1) 全 RNA の抽出	5
(2) RT-PCR (Reverse transcription- polymerase chain reaction)法	5
(3) RACE (Rapid amplification of cDNA ends)法	6
① 3'RACE 法	6
② 5'RACE 法	6
(4) TA-クローニング法	10
(5) 塩基配列決定法	12
実験結果	15
1. RT-PCR 法	15
(1) RT-PCR による増幅 DNA 断片の検討	15
(2) 形質転換菌のスクリーニング	16
(3) 塩基配列の決定	17
(4) アミノ酸配列の推定	18
2. RACE 法	19
(1) 3'RACE 法	20
① PCR による増幅 DNA 断片の検討	20
② 形質転換菌のスクリーニング	21
③ 塩基配列の決定	22
④ アミノ酸配列の推定	23
(1) 5'RACE 法	25
① PCR による増幅 DNA 断片の検討	25
② 形質転換菌のスクリーニング	26
③ 塩基配列の決定	27
④ アミノ酸配列の推定	28
3. コイカテプシン L 遺伝子の全一次構造の決定	29

(1) コイカテプシン L 遺伝子の全塩基配列	
及び推定アミノ酸配列	2 9
(2) コイカテプシン L 遺伝子の	
完全長 c DNA のクローニング	3 1
考察と小括	3 3
第二章 コイカテプシン L と他起源由来カテプシン L との	
比較生化学的研究	3 5
解析結果	3 6
1. 他起源由来カテプシン L とのアミノ酸配列の	
相同性の比較	3 6
2. 親水性・疎水性プロットによるプレ・プロ部の比較	4 5
考察及び小括	4 6
第三章 コイカテプシン L の大量発現系の構築に関する研究	4 8
実験方法	4 9
1. 実験用試薬及び機器	4 9
2. 実験方法	
(1) 酵素活性の測定	4 9
(2) タンパク質の定量	4 9
(3) SDS-PAGE	5 0
(4) イムノブロッティング法	5 0
(5) N 末端アミノ酸配列の決定	5 0
(6) 6×His tag 融合タンパク質発現系の構築	5 0
① pQE-9 発現用ベクターへの組込み	5 0
② 6×His tag 融合コイカテプシン L の誘導発現	5 0
(7) 6×His tag 融合プロカテプシン L の	
自己触媒的活性化の検討	5 1
実験結果	5 2
1. コイカテプシン L 遺伝子の発現用ベクターへの組込み	5 2
2. 6×His tag 融合プロカテプシン L の誘導発現	5 2
3. 6×His tag 融合プロカテプシン L の精製	5 3
4. N 末端アミノ酸配列の決定	5 4
5. 6×His tag 融合プロカテプシン L の	
自己触媒的活性化の検討	5 5
6. 精製酵素との酵素学的諸性質の比較検討	5 8

(1) 基質特異性の比較	5 8
(2) 酵素活性に及ぼす阻害剤の影響の比較検討	5 9
(3) 酵素活性に及ぼす pH の影響の比較検討	6 0
(4) 酵素活性に及ぼす温度の影響の比較検討	6 1
考察と小括	6 2

第四章 コイカテプシン L mRNA の組織分布

及び遺伝子構造に関する研究	6 5
実験方法	6 6
1. 試料魚	6 6
2. 実験用試薬及び機器	6 6
3. 実験方法	6 6
(1) ノーザンハイブリダイゼーション	6 6
① 全 RNA の抽出	6 6
② mRNA の精製	6 6
③ ノーザンブロッティング	6 6
④ ハイブリダイゼーション	6 6
⑤ DIG 検出	6 7
(2) コイカテプシン L 遺伝子の	
ゲノム DNA からのクローニング	6 7
① ゲノム DNA の調製	6 7
② PCR 法	6 7
実験結果	6 9
1. コイカテプシン L mRNA の組織分布	6 9
2. コイカテプシン L の遺伝子構造解析	7 1
考察及び小括	7 5

第五章 コイカテプシン L 様酵素遺伝子のクローニング

実験方法	7 9
1. 実験魚	7 9
2. 遺伝子組換え実験用試薬及び機器	7 9
3. 実験方法	7 9
(1) 全 RNA の抽出及び mRNA の精製	7 9
(2) RT-PCR	7 9
実験結果	8 0
考察及び小括	8 6

総括	88
謝辞	92
参考文献	93

緒言

細胞内の異物・老廃物の分解の大部分はリソゾームで行われている。タンパク質分解においても、細胞構成及び外来由来のタンパク質分解にはリソゾームのプロテアーゼが最も重要な役割を果たしている(Fig. 1)。それらリソゾームの主要なプロテアーゼはシステインプロテアーゼに属するカテプシン B,H,L,S 等のカテプシン群である。またカテプシン自身を含む多くのリソゾーマルシステインプロテアーゼのプロセッシングや代謝にもやはりカテプシン群が関与している。哺乳動物においては、これらリソゾーマルシステインプロテアーゼが関与していると思われるタンパク質分解異常に起因する多くの疾病が報告されている。また、組織の死後はその分解作用が顕著に現れるためタンパク質の自己消化が進行するものと考えられている。¹⁾

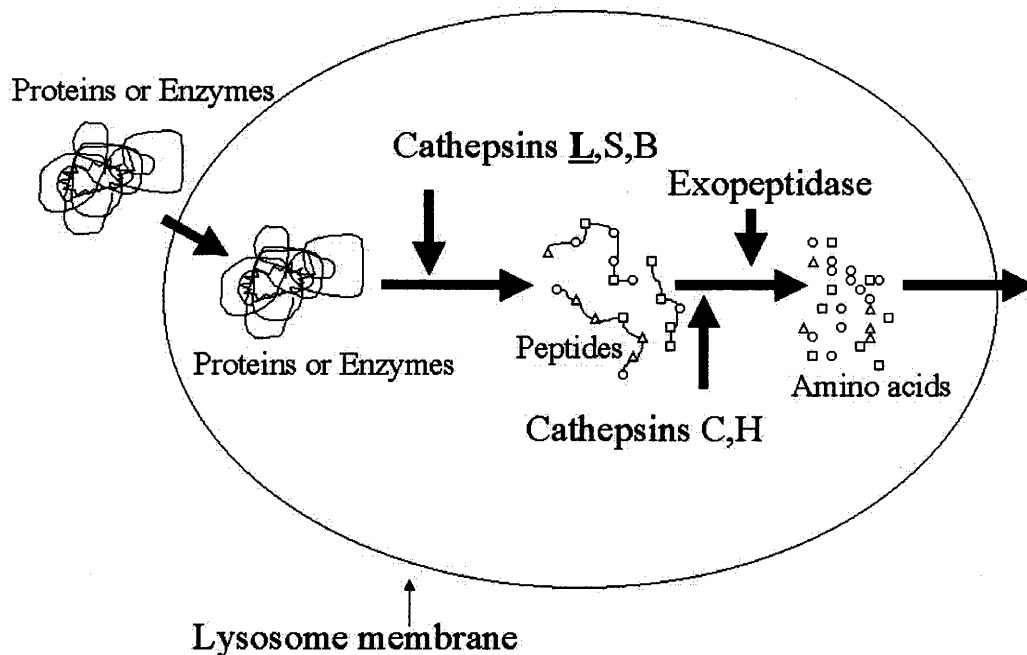


Fig. 1 Catabolism model of proteins in lysosome

カテプシン群の生合成及び活性化機構に関しては、まずリボソーム上で不活性前駆体酵素として合成され、シグナルペプチド（プレ部）の働きにより小胞体内へ輸送された後、プレ部が切断されプロ型酵素となり糖鎖が付加される。その後、ゴルジ体へ輸送され、ゴルジ体内で糖鎖内のマンノースの 6 位がリン酸化されることによって、それが標識となりリソゾームに運ばれる。カテプシン群はリソゾームに運ばれる過程で活性化され、リソゾーム内の細胞膜及びオルガネラ膜に接する領域に局在し、各種タンパク質の分解や生理活性ペプチドのプロセッシングに関与している。¹⁾ また、近年抗原提示細胞内において抗原ペプチドのプロセッシングや MHC-class II 分子のインバリアント鎖(Ii)のプロセッシング⁹⁾ と T 細胞の発達にこれらカテプシン群が深く関与しているという報告¹⁰⁾ がある。

カテプシン群は、至適 pH、阻害剤との相互作用、基質特異性及び分子量の違いから、それぞれ分類されている。その中でも強いエンドプロテアーゼ活性を有するのはカテプシン L (EC 3.4.22.15) である。²⁾ カテプシン L は、細胞内タンパク質分解のイニシエーションとして最も重要な酵素と考えられている。^{1,3)} 特に魚類においては、畜肉に比べてかなりの早さで筋タンパクが自己消化することが知られており、これらのリソゾーマルシステインプロテアーゼの働きや発現調節機構等は哺乳動物と異なっているものと思われる。

カテプシン L に関する研究は、ラット、^{4,5)} ヒト⁶⁾ 等の哺乳動物を中心に行なわれており、酵素学的諸性質、一次構造、活性化機構についての報告も多く、プレ・プロ部のプロセッシング機構も明らかにされている。^{7,8)} また、抗原提示細胞内での MHC-class II 分子のインバリアント鎖のプロセッシングに必要な酵素であることがわかってる。⁹⁾

一方、魚類においては、カテプシン L に関する知見が少ない。Aranishi らがコイ (*Carp Cyprinus carpio*) 肝臓、¹¹⁾ Yamashita らがシロザケ (*Chum salmon Oncorhynchus keta*) 筋肉中、¹²⁾ また、当研究室の榎本¹³⁾ と Aranishi^{11,14)} がコイ腹腔マクロファージのカテプシン L に関する報告を行なっているが、これらの研究では精製法及び酵素学的諸性質を調べるにとどまっている。また、当研究室の土井はコイ肝臓カテプシン L の N 末端 15 残基のアミノ酸配列¹⁵⁾ を、益富が遺伝子クローニングによりコイ腹腔マクロファージ由来カテプシン L の成熟型酵素の一次構造を、¹⁶⁾ Vogel らがゼブラフィッシュ (*Zebrafish Danio rerio*) より全一次構造を報告している。¹⁷⁾ また、近年 Kwon らがニジマス (*Rainbow trout Oncorhynchus mykiss*)¹⁸⁾ より、Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に Watabe らがマイワシ (*Japanese anchovy Engraulis japonicus*) (GenBank accession number AB081845) より、Aoki らが Expressed sequence tag (EST) 解析によるヒラメ (*Japanese flounder Paralichthys olivaceus*) (GenBank accession number AU090674, AU090958, AU090833) カテプシン L の全一次構造あるいは部分配列を報告している。しかし、これらの報告では酵素精製などはしておらず、構造決定及び発現レベルを調べるにとどまっているのが現状である。魚類カテプシン L の生理的機能を解明するためには、酵素学的諸性質を明らかにすると同時に構造解析を行うことが必要不可欠である。

当初 Aranishi らの報告によればコイカテプシン L の成熟型酵素は哺乳類と同じく SDS-

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で 24・25 kDa の重鎖と 5 kDa の軽鎖からなる two-chain form であると報告している。¹¹⁾ しかし、土井¹⁵⁾ や槌本¹³⁾ の報告例ではコイカテプシン L は哺乳類とは異なり 28・29 kDa の single-chain form であるという興味深い結果が得られている。この違いを詳しく調べるには構造解析が必要不可欠であるが、コイカテプシン L の全一次構造に関するデータはない。タンパク側からカテプシン L の全一次構造を解明するには大量の精製酵素を必要とし非常に困難である。また生合成及び活性化機構を明らかにするにはプレ・プロ部を持った不活性前駆体酵素が必要であるが、そのためには遺伝子組換え技術を用いて大腸菌等による大量発現系の構築が必要である。さらに生理的機能を明らかにするためには、まずその発現様式を抑えておく必要がある。

そこでまず[第一章]では、コイ肝臓のカテプシン L 遺伝子(mRNA)のクローニングを行ない、全一次構造を明らかにした。次に[第二章]では推定したアミノ酸配列と種々のカテプシン L との比較を行ない、魚類カテプシン L と哺乳類カテプシン L との一次構造レベルでの違いを考察した。次いで[第三章]ではコイカテプシン L 抗体の作成及びそれらを使った活性化機構の解明を行なうために必要な大腸菌での大量発現系の構築を行い、発現酵素の自己活性化及び酵素学的諸性質について検討した。また[第四章]ではコイカテプシン L の遺伝子構造及び mRNA の組織分布について検討した。最後に[第五章]ではコイカテプシン L のアイソフォームの有無を確認するために、酵素学的諸性質及び構造的に非常に類似のカテプシン S の遺伝子クローニングを行なった。

第一章 コイカテプシン L 遺伝子のクローニング

本章では、コイ肝臓カテプシン L 遺伝子のクローニング及び全一次構造の決定について述べる。

カテプシン L の機能解析を行なうには酵素学的諸性質を明らかにすると同時に全一次構造の決定が必要不可欠である。哺乳類カテプシン L においては酵素学的諸性質並びに全一次構造が解明され、本来の細胞内タンパク質分解以外の生理的な機能が徐々に明らかにされている。しかし魚類に関しては酵素学的な知見は多々あるが、一次構造に関する知見が少く生理的機能の解析などはほとんど行われていないのが現状である。また、タンパク側からカテプシン L の全一次構造を解明するのは大量の精製酵素を必要とし非常に困難である。しかしタンパク質合成の設計図である遺伝子の構造を調べれば、これらの問題も解決する。そこで本研究では機能解析の足がかりとしてコイ肝臓より全 RNA を抽出し、カテプシン L 遺伝子のクローニングを行なった。

実験方法

1. 実験魚

幸田水産(株)より購入した養殖コイ(魚体重約 0.8~1.0 kg)より肝臓を摘出し、ただちに RNA 抽出に使用した。

2. 遺伝子組換え実験試薬及び機器

試薬は特に明記しない限り、和光純薬工業社製の特級試薬を用いた。実験に用いるピペット、ピペットチップ及び試薬ビン等は、オートクレーブ(121℃, 20 min)もしくは乾熱滅菌処理(180℃, 2 h)した。泳動装置には、ミニゲル電気泳動システム Mupid-2(COSMO BIO 社製)を用いた。PCR には、GeneAmp™ PCR System 2400(Applied Biosystems 社製)を使用した。逆転写酵素には Super Script RT (GIBCO 社製)を、*Taq* DNA ポリメラーゼには、AmpliTaq Gold™(Applied Biosystems 社製)を用いた。プライマーに使用した合成オリゴヌクレオチドは GIBCO 社に委託合成した。TA クローニング法には、pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega 社製)を、培地作成用試薬には BACTO® Tryptone, BACTO® Yeast Extract(DIFCO 社製)を用いた。サイクルシーケンシング反応には GeneAmp™PCR System 2400(Applied Biosystems 社製)を、試薬には Big Dye™Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製)を用いた。塩基配列の決定には DNA Sequencing System ABI PRISM™377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社製)を用いた。シーケンシングデータの解析には遺伝子解析ソフト GENETYX-MAC Ver 7.3(ソフトウェア開発社製)と DNASIS Mac Ver 3.5(日立ソフトウェアエンジニアリング社製)を用いた。

3. 実験方法

(1) 全 RNA の抽出

コイ肝臓からの全 RNA の抽出は、全 RNA 単離試薬 ISOGEN (NIPPON GENE 社製)を用い、そのプロトコールに従って行なった。

(2) RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)法

一本鎖 cDNA を合成するために、5'末端にアンカープライマー(APS-BR; 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3')配列をもつ oligo-dT(CDS-BR; 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)¹⁷-3')プライマーを用いて逆転写反応を行なった。なお、以下この章で使用したプライマー及び概略については Fig. 2 に示した。

次いで精製酵素の N 末端アミノ酸配列¹⁵⁾に基づいて作成したプライマー(CL-4M; 5'-ACTGGAGAGAA(A/G)AAGG(A/T/C)(T/G)AC(T/G)-3' とカテプシン群で特に種間で保存されている領域(His¹⁵⁸ (Papain number) 近傍)で作成したプライマー(CAL-H; 5'-TA(A/C/GT)CC(A/C/G/T)AC(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)A(A/G)(A/C/G/T)AC(A/C/G/T)CC(A/G)TG-3')を使用して、合成した一本鎖 cDNA を鋳型に、94℃, 1 min; 55℃, 1 min; 72℃, 2 min: 40 cycles で PCR 反応を行なった。なお、RT-PCR 法の概略を Fig.3 に示した。

(3) RACE(rapid amplification of cDNA ends)法

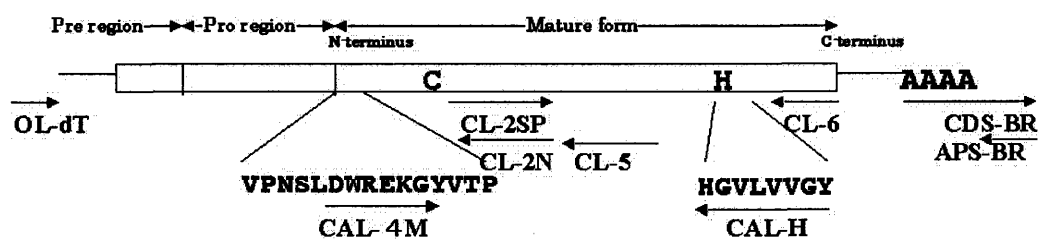
① 3'RACE 法

一本鎖 cDNA の合成及び PCR 反応については、実験方法(2) RT-PCR の項と同様である。なお PCR 法に使用したプライマーは RT-PCR 法の結果に基づきデザインしたコイカテプシン L 特異的プライマー CL-2SP(5'-CTGAGTGAGCAGAACCTGGTGG-3')とアンカープライマー APS-BR である。

② 5'RACE 法

始めに実験方法(2) RT-PCR の項と同様の方法で一本鎖 cDNA の合成を行なった。ただし、一本鎖 cDNA を合成するためにコイカテプシン L 特異的プライマー CL-6(5'-TTAGACGAGAGGGTAGCTAGCAG-3')を使用した。次いでターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ (Terminal deoxynucleotidyl transferase; TdT)により 5'末端に poly(A)を付加させ、これを 5'RACE における PCR の鋳型とした。次いでコイカテプシン L 特異的プライマー CL-5(5'-GCCTCGTTGCCTTCAGGAC-3')と poly(A)に相補的なプライマー OL-dT(5'-GCGAATTC(T)¹⁹-3')を使用し、94℃, 1 min; 45℃, 1 min; 72℃, 2 min: 45 cycles で first PCR を行なった。次いで得られた PCR 反応産物を鋳型にしてコイカテプシン L 特異的プライマー CL-2N(5'-CCACCAGGTTCTGCTCACTCAG-3')と OL-dT プライマーにて、94℃, 1 min; 55℃, 1 min; 72℃, 2 min: 40 cycles で semi-nested PCR を行なった。

なお、3'及び 5'-RACE 法の概略については Fig.3 と Fig.4 にそれぞれ記した。



Primer design for RT-PCR

CAL-4M 5'-ACTGGAGAGAARAAGGHHACK-3'
 CAL-H 5'-TANCCNACNGCNARNACNCCRTG-3'

for 5'RACE

CL-5 5'-GCCCTCGTTGCCTTCAGGAC-3'
 CL-2N 5'-CCACCAGGTTCTGCTCACTCAG-3'
 OL-dT 5'-GCGAATTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

for 3'RACE

CL-2SP 5'-CTGAGTGAGCAGAACCTGGTGG-3'
 APS-BR 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'

for first strand cDNA synthesis

CDS-BR 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
 CL-6 5'-TTAGACGAGAGGGTAGCTAGCAG-3'

Fig.2. Strategy of molecular cloning of carp cathepsin L.

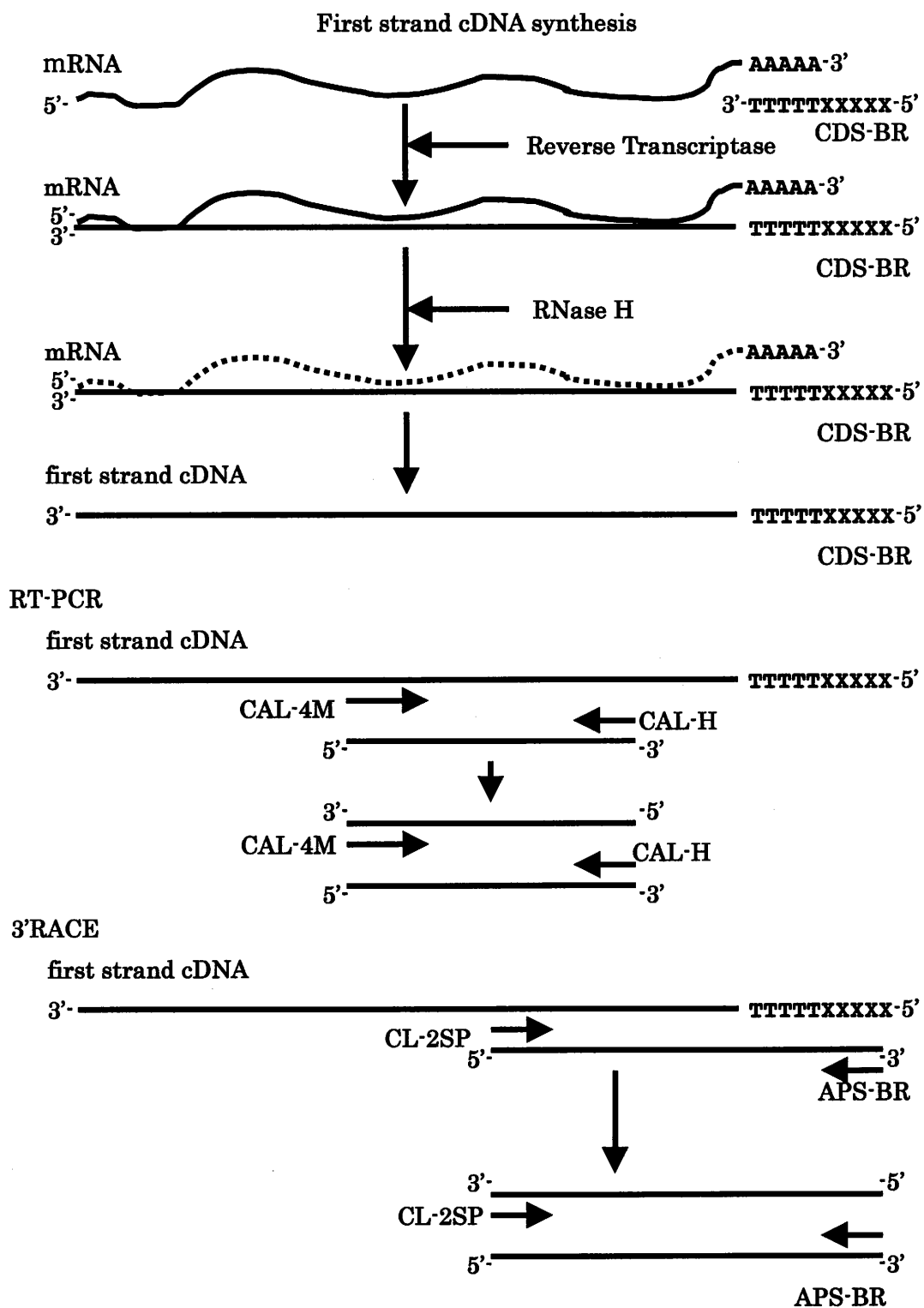
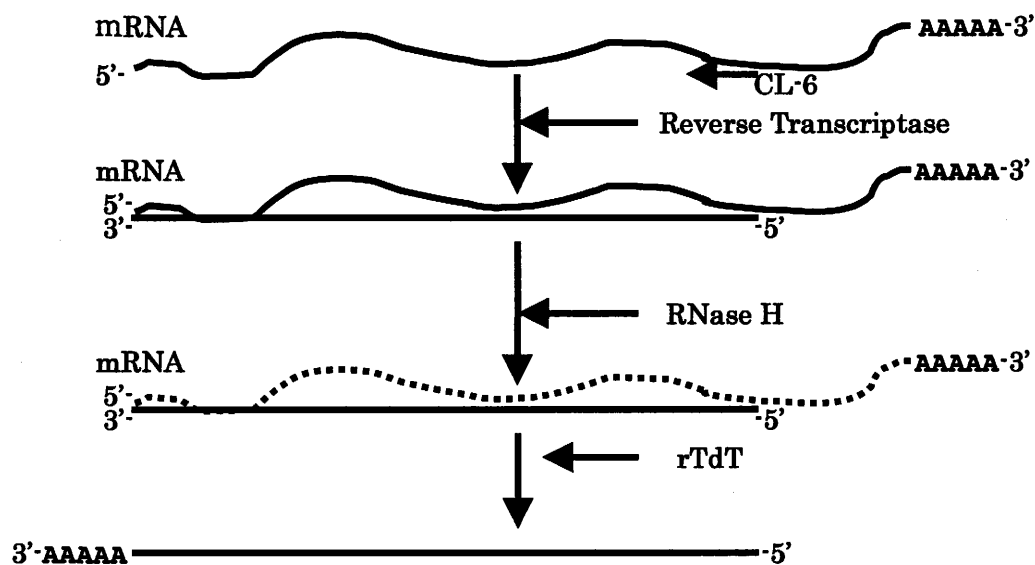


Fig.3. Outline of first strand cDNA synthesis, RT-PCR and 3'RACE

First strand cDNA synthesis and TdT reaction



5'RACE

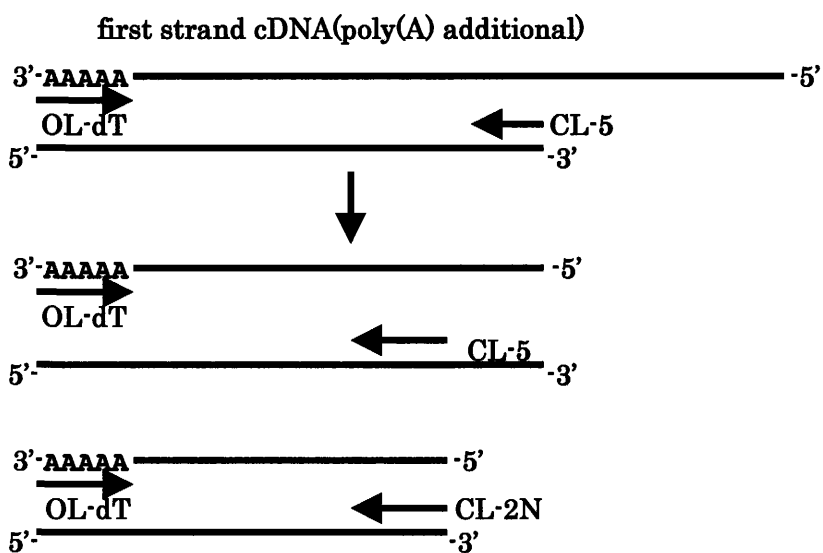


Fig.4. Outline of first strand cDNA synthesis for 5'RACE, TdT reaction and 5'RACE

(4) TA クローニング法

以下に示した手順で実験操作を行なった。

pGEM®-T Easy Vector Systems を用いライゲーション反応を行なった。試料を以下のよう
に調製した。

dH ₂ O	3-X µl
2×Rapid Ligation Buffer	5 µl
pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1 µl
PCR product	X µl
T4 DNA ligase	1 µl
Total	10 µl

以上を混合した後、冷蔵庫に1晩置いた(4℃反応)。その後、以下 Fig.5 の手順で形質転換を行なった。

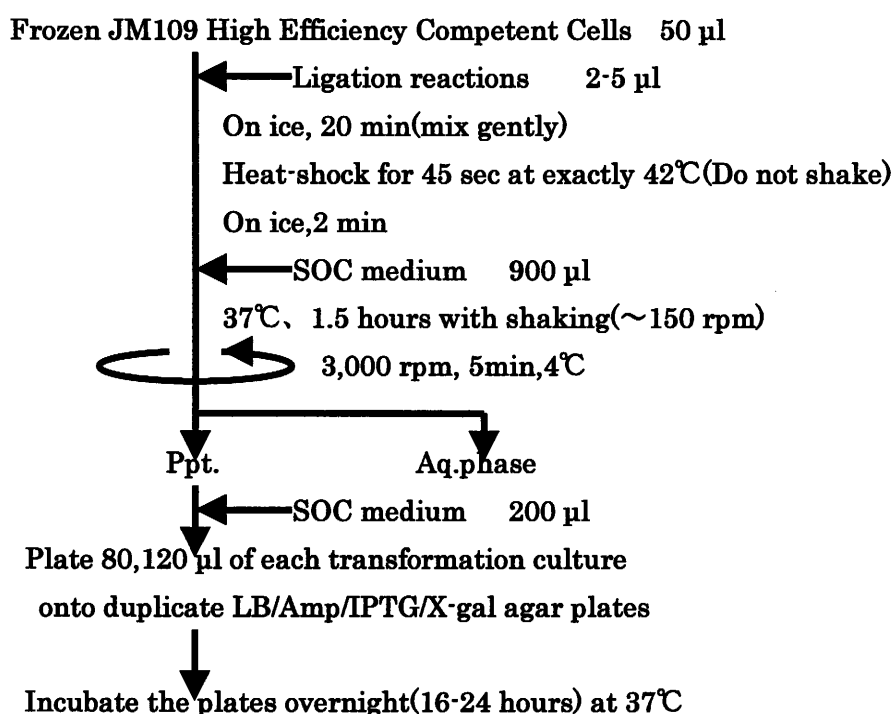
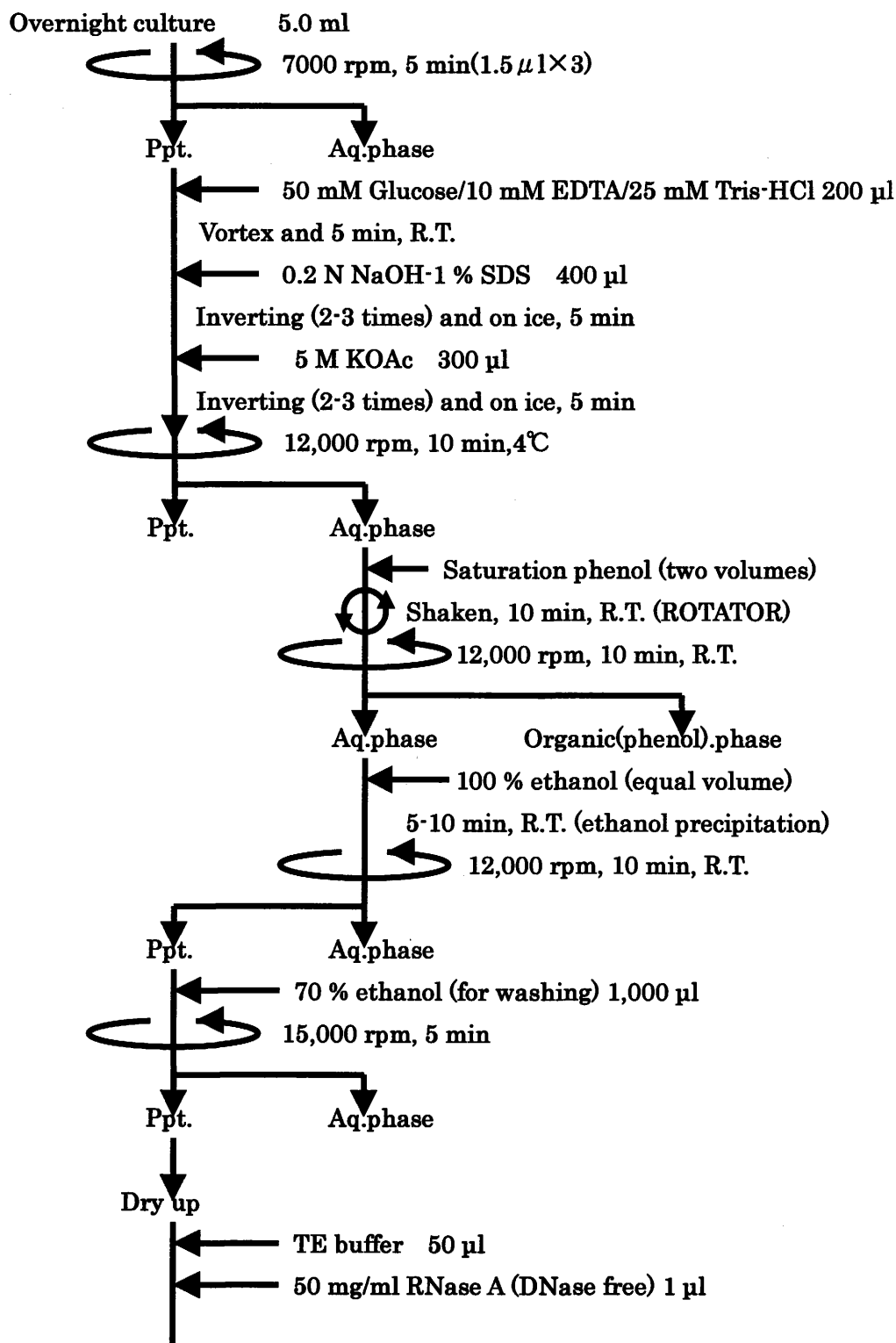


Fig.5. Protocol of transformation. LB; Luria-Bertani's broth (1 % BACTO® Tryptone , 5 % BACTO® Yeast Extract, 5 % NaCl, pH 7.0), Amp; 0.0005 % Ampicilline, IPTG; 100 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, dioxane free, X-gal; 40 mg/ml X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside).

形質転換後、 β -ガラクトシダーゼ(-)の形質転換株である白色コロニーだけを選んで5 ml の LB 培地に植菌し、37℃で一晩振とう (160 rpm/min)した。その後、培養した形質転換菌よりアルカリ・SDS 法(Fig.6)でプラスミド DNA を調製しシーケンス反応の試料とした。



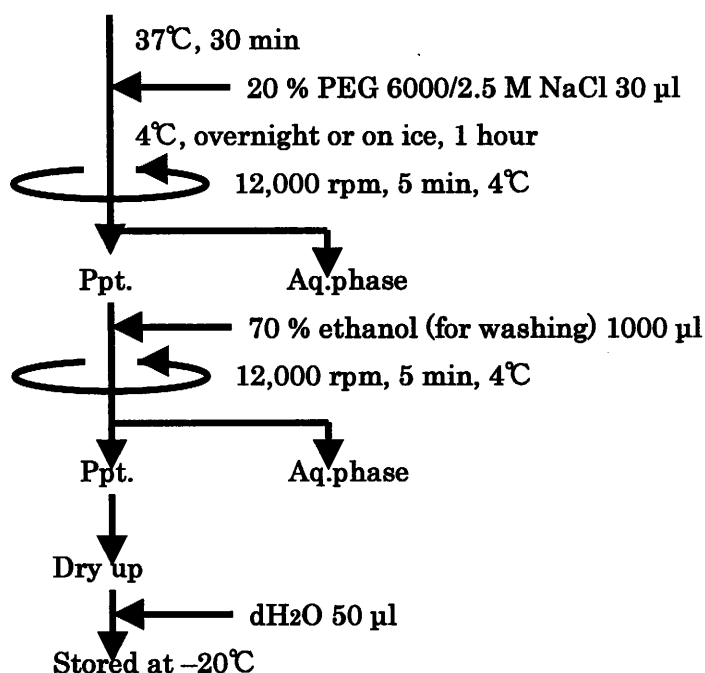


Fig.6. Preparation of plasmid DNA by alkali-SDS method.

(5) 塩基配列決定法 (シーケンス)

DNA 塩基配列決定にはダイデオキシ法 (Sanger 法)¹⁷⁾ を改良した、サーマルサイクラーを用いて行なうサイクルシーケンス法を採用し、蛍光で標識された ddNTP を用いたダイターミネーター法で行なった。アルカリ・SDS 法(Fig. 6)で調製したプラスミド DNA をテンプレートとして用い、ダイターミネーターサイクルシーケンスを行なった。得られた反応産物は ABI PRISM™377 DNA Sequencer にセットし塩基配列を決定した。操作手順を Fig.7- (1), (2). に示す。

Cycle sequencing reaction

Ds-DNA(plasmid DNA)

Quantitate the amount of purified DNA by 200-500 ng

Cycle sequencing

d. water	12-X μ l
BigDye Terminator Ready Reaction Mix	4 μ l
template(plasmid DNA)	X μ l
Primer(0.8 pmol/ μ l)	4 μ l
Total	20 μl

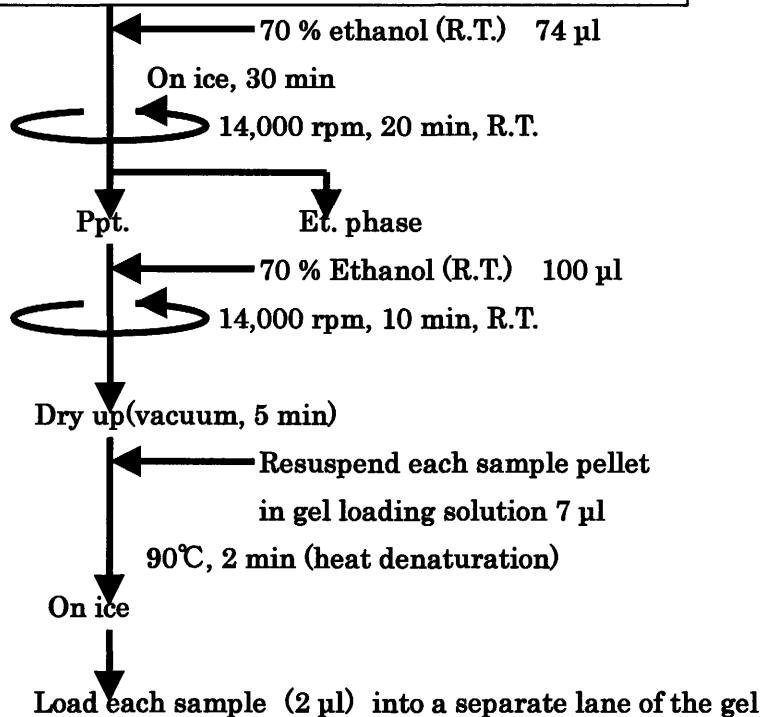
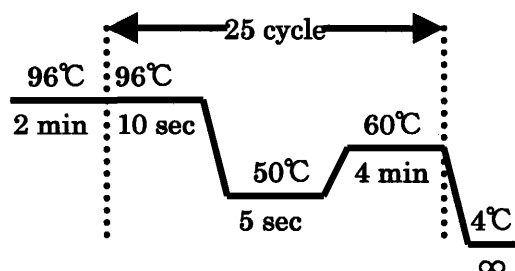


Fig.7- (1). Procedure of dye terminator cycle sequencing (cycle sequencing reaction)

Preparing gels

Preparing the plate and the gel cassette (36 cm)



Preparing acrylamide denaturing gels

Urea	18 g
Super Reading DNA Sequence Solution (50 % Acrylamide stock solution, TOYOBO)	5 ml
10 % TBE buffer	5 ml
Deionized H ₂ O	20 ml



To 50 ml with deionized H₂O

Filter the acrylamide solution

through a 0.2- μ m cellulose nitrate filter



Degas for 5 min

← 10 % Ammonium persulfate (APS) 250 μ l

← TEMED 25 μ l

Draw the prepared gel solution into a 60-cc syringe

(At least two hours to ensure complete polymerization)

Using the ABI PRISM™377 DNA sequencer

Setting up the instrument



Setting up the software



Loading samples



Observing instrument status and data



For analyzing the data

Fig.7- (2). Procedure of dye terminator cycle sequencing

実験結果

1. RT-PCR 法

(1) RT-PCR による増幅 DNA 断片の検討

RT-PCR (実験方法 (2) 参照) による増幅 DNA 断片をアガロースゲル電気泳動(AGE)に供した結果、約 540bp 付近に特異的な増幅 DNA 断片が確認された(Fig. 8)。この増幅 DNA 断片をアガロースゲルから抽出精製した後、pGEM®-T Easy ベクターに挿入しクローニングした。

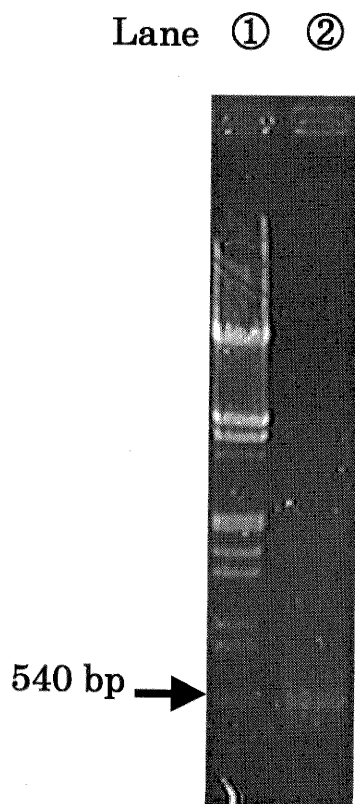


Fig.8. Agarose gel electrophoresis (1.2 %) of the RT-PCR products. ①, λ Hind III·EcoR I double digest marker; ②, RT-PCR products

(2) 形質転換菌のスクリーニング

実験方法(4)で選択した白色コロニーからアルカリ-SDS法により、プラスミドDNAを調製し、*Eco*RI消化を行なって、挿入DNA断片のサイズを確認することにより、RT-PCR産物の形質転換菌のスクリーニングを行なった。その結果をFig. 9に示した。クローン①、②、③に目的のサイズ(約600 bp)の断片が含まれていることがわかった。

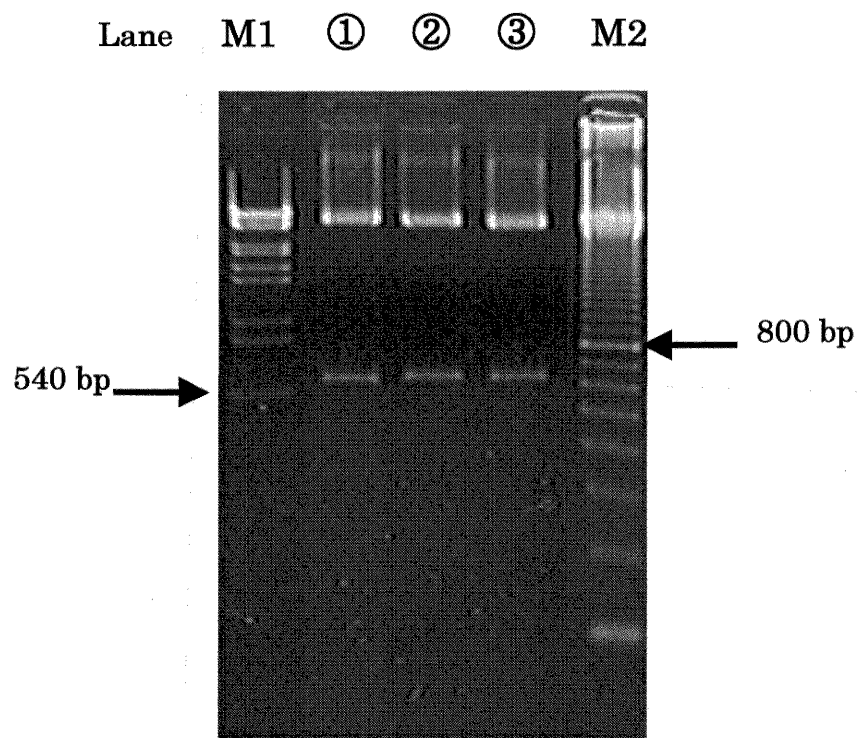


Fig.9. Preparation of plasmid DNA by alkali-SDS method. M1, λ /*Hind* III-*Eco*R I double digest marker; ①, ②, ③, plasmid DNA digested by *Eco*R I; M2, 100 bp DNA ladder. Clone numbers were indicated by numerals into circles.

(3) 塩基配列の決定

実験方法(5)に従い、クローン①～③のプラスミド DNA を DNA シークエンサーに供し、塩基配列の決定を行った。その結果を Fig. 10 に示す。全長 499 bp のクローンが得られた。

```
1  ACTGGAGAGA AAAGGGATAC GTGACTCCCG TGAAAGATCA GGGTGAGTGT GGTTCCTTGCT 60
61  GGGCCTTCAG CACTACTGGA GCCATGGAGG GTCAGATGTT CAGGAAGACC GGAAAACCTGG 120
121 TGTCTCTGAG TGAGCAGAAC CTGGTGGACT GCTCCCGTCC TGAAGGCAAC GAGGGCTGTA 180
181 ATGGAGGTCT AATGGACCAG GCTTTCCAGT ACATCAAGGA CCAGAACGGT CTGGACTCAG 240
241 AGGAGTCCTA CCCCTATGTG GGAAGTGATG ATCAGCCCTG CCATTATGAT CCCAAATACA 300
301 GCGCAGCTAA TGACACTGGA TTCGTTGACA TTCCCAGTGG AAAGGAACAT GCTCTGATGA 360
361 AGGCTATAGC TGCTGTGGGG CCAGTGTCTG TGGCTATTGA CGCCGGACAC GAGTCTTTCC 420
421 AGTTCTACCA GTCAGGCATC TACTATGAGA AAGAATGCAG CAGCGAGGAG CTAGATCATG 480
481 GTGTGCTTGC CGTTGGTTA 499
```

Fig.10. Nucleotide sequence of RT-PCR products (clone①-③).

(4) アミノ酸配列の推定

実験結果 1- (3) で得られた塩基配列から推定したアミノ酸配列を Fig.11 に示した。第 3 フレームに ORF(Open Reading Frame, 翻訳領域)が見られた。□ で囲んだアミノ酸配列が土井¹⁵⁾ がコイ肝臓より精製したカテプシン L の N 末端アミノ酸配列と一致したことから、このクローンはコイカテプシン L 遺伝子の部分配列であると断定した。

```
1  ACTGGAGAGAAAAGGGATACGTGACTCCCGTGAAAGATCAGGGTGAGTGTGGTTCTTGCT 60
    W R E K G Y V T P V K D Q G E C G S C W
61  GGGCCTTCAGCACTACTGGAGCCATGGAGGGTCAGATGTTTCAGGAAGACCGGAAAACCTGG 120
    A F S T T G A M E G Q M F R K T G K L V
121 TGTCTCTGAGTGAGCAGAACCTGGTGGACTGCTCCCGTCCTGAAGGCAACGAGGGCTGTA 180
    S L S E Q N L V D C S R P E G N E G C N
181 ATGGAGGTCTAATGGACCAGGCTTTCCAGTACATCAAGGACCAGAACGGTCTGGACTCAG 240
    G G L M D Q A F Q Y I K D Q N G L D S E
241 AGGAGTCCTACCCCTATGTGGGAACCTGATGATCAGCCCTGCCATTATGATCCCAAATACA 300
    E S Y P Y V G T D D Q P C H Y D P K Y S
301 GCGCAGCTAATGACACTGGATTCTGTTGACATTCCAGTGGAAGGAACATGCTCTGATGA 360
    A A N D T G F V D I P S G K E H A L M K
361 AGGCTATAGCTGCTGTGGGGCCAGTGTCTGTGGCTATTGACGCCGGACACGAGTCTTTCC 420
    A I A A V G P V S V A I D A G H E S F Q
421 AGTTCTACCAGTCAGGCATCTACTATGAGAAAGAATGCAGCAGCGAGGAGCTAGATCATG 480
    F Y Q S G I Y Y E K E C S S E E L D H G
481 GTGTGCTTGCCGTTGGTTA 500
    V L A V G
```

Fig.11. Nucleotide and deduced amino acid sequence of RT-PCR products (clone①-③). N-terminal amino acid sequences of purified carp cathepsin L are boxed.

2. RACE 法

RT-PCR の結果より、3'RACE, 5'RACE 用にプライマーを新たに設計した。その場所と配列を Fig.12 に示した。

1	ACTGGAGAGA	AAAGGGATAC	GTGACTCCCG	TGAAAGATCA	GGGTGAGTGT	GGTTCTTGCT	60
61	GGGCCTTCAG	CACTACTGGA	GCCATGGAGG	GTCAGATGTT	CAGGAAGACC	GGAAAAC TGG	120
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div> CL-2SP → </div> <div>← CL-2N</div> <div>← CL-5</div> </div>						
121	TGTCTCTGAG	TGAGCAGAAC	CTGGTGGACT	GCTCCCGTCC	TGAAGGCAAC	GAGGGCTGTA	180
181	ATGGAGGTCT	AATGGACCAG	GCTTTCCAGT	ACATCAAGGA	CCAGAACGGT	CTGGACTCAG	240
241	AGGAGTCCTA	CCCCTATGTG	GGAAGTGTG	ATCAGCCCTG	CCATTATGAT	CCCAAATACA	300
301	GCGCAGCTAA	TGACACTGGA	TTCGTTGACA	TTCCCAGTGG	AAAGGAACAT	GCTCTGATGA	360
361	AGGCTATAGC	TGCTGTGGGG	CCAGTGTCTG	TGGCTATTGA	CGCCGGACAC	GAGTCTTTCC	420
421	AGTTCTACCA	GTCAGGCATC	TACTATGAGA	AAGAATGCAG	CAGCGAGGAG	CTAGATCATG	480
481	GTGTGCTTGC	CGTTGGTTA					499

for 5'RACE

CL-5 5'-GCCCTCGTTGCCTTCAGGAC-3'

CL-2N 5'-CCACCAGGTTCTGCTCACTCA-3'

for 3'RACE

CL-2SP 5'-CTGAGTGAGCAGAACCTGGTGG-3'

Fig.12. Design of primer for 5'RACE and 3'RACE

(1) 3'RACE

① PCR による増幅 DNA 断片の検討

PCR による増幅 DNA 断片を AGE に供し Fig.13 の結果を得た。約 860 bp 付近に特異的な増幅 DNA 断片が確認されたため、この増幅 DNA 断片をアガロースゲルから抽出し、クローニングした。

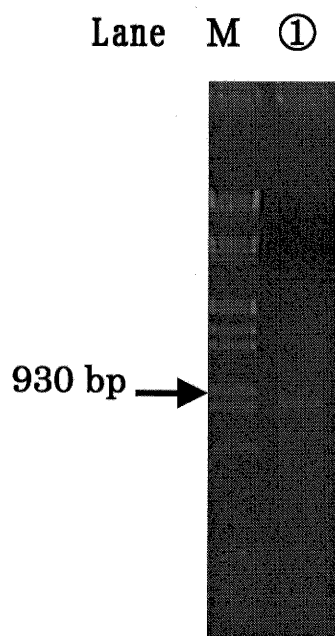


Fig.13. Agarose gel electrophoresis (1.2 %) of the PCR products by 3'RACE. M, λ /Hind III·EcoR I double digest marker; ①, 3'RACE products.

② 形質転換菌のスクリーニング

実験方法（４）に従いアルカリ-SDS 法によりプラスミド DNA を調製した。その結果を Fig. 14 に示した。

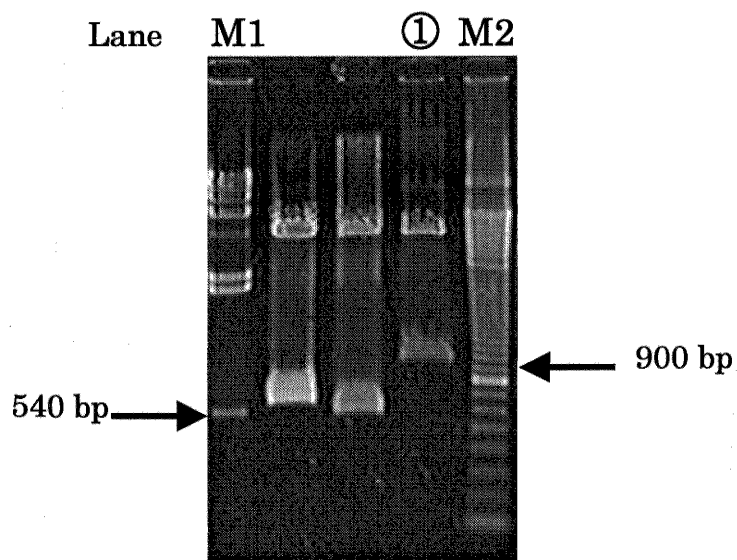


Fig.14. Preparation of plasmid DNA by alkali-SDS method for sequence. M1, λ /Hind III marker; ①, plasmid DNA digested by *EcoR* I; M2, 100 bp DNA ladder.

③ 塩基配列の決定

実験方法（５）に従い、クローン化された 3'RACE 法による増幅 DNA 断片①（Fig.14）を DNA シークエンサーに供し、塩基配列の決定を行った。その結果を Fig.15 に示す。全長 881 bp のクローンが得られた。

```

1  CTGAGTGAGC AGAACCTGGT GGACTGCTCC CGTCCTGAAG GCAACGAGGG CTGTAATGGA 60
61  GGTCTAATGG ACCAGGCTTT CCAGTACATC AAGGACCAGA ACGGTCTGGA CTCAGAGGAG 120
121 TCCTACCCCT ATGTGGGAAC TGATGATCAG CCCTGCCATT ATGATCCCAA ATACAGCGCA 180
181 GCTAATGACA CTGGATTTCGT TGACATTCCC AGTGGAAAGG AACATGCTCT GATGAAGGCT 240
241 ATAGCTGCTG TGGGGCCAGT GTCTGTGGCT ATTGACGCCG GACACGAGTC TTTCCAGTTC 300
301 TACCAGTCAG GCATCTACTA TGAGAAAGAA TGCAGCAGCG AGGAGCTAGA TCATGGTGTG 360
361 CTTGCCGTTG GTTATGGTTT TGAGGGTGAG GATGTTGATG GAAAGAAGTA TTGGATTGTC 420
421 AAGAACAGCT GGAGTGAGAA TTGGGGTGAT AAAGGTTATG TCTACATGGC CAAGGACAGA 480
481 CACAACCACT GTGGTATTGC TACAGCTGCT AGCTACCCTC TCGTCTAAGA AGGATGCCTA 540
541 CAGTATCAAG ACATAGTAGC AGAAGATCAC ATTAGTGGTA AACTGAAACC CACTAGTTTA 600
601 GTGAGTAAGG AGTCACCTGA CACGGGTGAC TGTGTCTCAC AGCCTGACTG AGAGAAACCT 660
661 CAAGCTCTAG ATATTGTGTG ACACTGTTTT AGGGAATTTA TGCAATTGTT TTTTTTGGTT 720
721 ATTTTAATGC CGCTGATTTA GTTGATTTTT GCCTCAATGT AAATACATAT TCTTCAGTGT 780
781 CTAAATGTAC AAATGTGTTT TTATTTATAC ATTCTGTATG ATCAATAAAA CTTTTTAAAA 840
841 ATTTAAAAAA AAAAAAAAAA AGTACTAGTC GACGCGTGGC C 881

```

Fig.15. Nucleotide sequence of 3'RACE products.

④ アミノ酸配列の推定

実験結果 2-(1)-③で得られた塩基配列から推定されるアミノ酸配列を Fig.16 に示した。第 1 フレームに ORF が見られた。下線部で示した塩基配列が RT-PCR で得られたクローンの塩基配列 (Fig.10) と完全に一致したことから、このクローンはコイカテプシン L 遺伝子の poly-(A)を含む 3'末端配列であると断定した。poly(A) シグナルと思われる配列 (AATAAA)が確認できた。

111	<u>CTGAGTGAGCAGAACCTGGTGGACTGCTCCCGTCCTGAAGGCAACGAGGGCTGTAATGGA</u>	60
	L S E Q N L V D C S R P E G N E G C N G	
161	<u>GGTCTAATGGACCAGGCTTTCCAGTACATCAAGGACCAGAACGGTCTGGACTCAGAGGAG</u>	120
	G L M D Q A F Q Y I K D Q N G L D S E E	
121	<u>TCCTACCCCTATGTGGGAAGTATGATGATCAGCCCTGCCATTATGATCCCAAATACAGCGCA</u>	180
	S Y P Y V G T D D Q P C H Y D P K Y S A	
181	<u>GCTAATGACACTGGATTTCGTTGACATTTCCAGTGGAAAGGAACATGCTCTGATGAAGGCT</u>	240
111	A N D T G F V D I P S G K E H A L M K A	
241	<u>ATAGCTGCTGTGGGGCCAGTGTCTGTGGCTATTGACGCCGGACACGAGTCTTTCCAGTTC</u>	300
111	I A A V G P V S V A I D A G H E S F Q F	
301	<u>TACCAGTCAGGCATCTACTATGAGAAAGAATGCAGCAGCGAGGAGCTAGATCATGGTGTG</u>	360
111	Y Q S G I Y Y E K E C S S E E L D H G V	
361	<u>CTTGCCGTTGGTTATGGTTTTGAGGGTGAGGATGTTGATGGAAAGAAGTATTGGATTGTC</u>	420
	L A V G Y G F E G E D V D G K K Y W I V	
420	<u>AAGAACAGCTGGAGTGAGAATTGGGGTGATAAAGGTTATGTCTACATGGCCAAGGACAGA</u>	480
	K N S W S E N W G D K G Y V Y M A K D R	
481	<u>CACAACCACTGTGGTATTGCTACAGCTGCTAGCTACCCTCTCGTCTAAGAAGGATGCCTA</u>	540
	H N H C G I A T A A S Y P L V *	
541	CAGTATCAAGACATAGTAGCAGAAGATCACATTAGTGGTAAACTGAAACCCACTAGTTTA	600
601	GTGAGTAAGGAGTCACCTGACACGGGTGACTGTGTCTCACAGCCTGACTGAGAGAAACCT	660
661	CAAGCTCTAGATATTGTGTGACACTGTTTTAGGGAATTTATGCAATTGTTTTTTTGGTT	720
721	ATTTTAATGCCGCTGATTTAGTTGATTTTGCCCTCAATGTAAATACATATTCTTCAGTGT	780
781	CTAAATGTACAAATGTGTTTTATTATACATTCTGTATGATCAATAAACTTTTTAAAA	840
781	ATTTAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCC	881

Fig.16. Nucleotide and deduced amino acid sequences of 3'RACE products. The consensus polyadenylation signal sequences are AATAAA. Confirmed sequences of RT-PCR are underlined.

3'RACE 法の結果より、5'RACE 法の一本鎖 cDNA 合成用に終止コドン部分を含むプライマー (CL-6) を新たに設計した。その場所と配列を Fig.17 に示した。

1	CTGAGTGAGC	AGAACCTGGT	GGACTGCTCC	CGTCCTGAAG	GCAACGAGGG	CTGTAATGGA	60
61	GGTCTAATGG	ACCAGGCTTT	CCAGTACATC	AAGGACCAGA	ACGGTCTGGA	CTCAGAGGAG	120
121	TCCTACCCCT	ATGTGGGAAC	TGATGATCAG	CCCTGCCATT	ATGATCCCAA	ATACAGCGCA	180
181	GCTAATGACA	CTGGATTTCGT	TGACATTCCC	AGTGGAAAGG	AACATGCTCT	GATGAAGGCT	240
241	ATAGCTGCTG	TGGGGCCAGT	GTCTGTGGCT	ATTGACGCCG	GACACGAGTC	TTTCCAGTTC	300
301	TACCACTCAG	GCATCTACTA	TGAGAAAGAA	TGCAGCAGCG	AGGAGCTAGA	TCATGGTGTG	360
361	CTTGCCGTTG	GTTATGGTTT	TGAGGGTGAG	GATGTTGATG	GAAAGAAGTA	TTGGATTGTC	420
421	AAGAACAGCT	GGAGTGAGAA	TTGGGGTGAT	AAAGGTTATG	TCTACATGGC	CAAGGACAGA	480
481	CACAACCACT	GTGGTATTGC	TACAGCTGCT	AGCTACCCTC	TCGTCTAAGA	AGGATGCCTA	540
				←	CL-6		
541	CAGTATCAAG	ACATAGTAGC	AGAAGATCAC	ATTAGTGGTA	AACTGAAACC	CACTAGTTTA	600
601	GTGAGTAAGG	AGTCACCTGA	CACGGGTGAC	TGTGTCTCAC	AGCCTGACTG	AGAGAAACCT	660
661	CAAGCTCTAG	ATATTGTGTG	ACACTGTTTT	AGGGAATTTA	TGCAATTGTT	TTTTTTGGTT	720
721	ATTTTAATGC	CGCTGATTTA	GTTGATTTTT	GCCTCAATGT	AAATACATAT	TCTTCAGTGT	780
781	CTAAATGTAC	AAATGTGTTT	TTATTTATAC	ATTCTGTATG	ATCAATAAAA	CTTTTTAAAA	840
841	ATTTAAAAAA	AAAAAAAAAA	AGTACTAGTC	GACGCGTGGC	C		881

CL-6 5'-TTAGACGTGTGGGTAGCTAGCTG-3'

Fig.17. Design of primer for first-strand cDNA synthesis (5'RACE)

(2) 5'RACE

① PCR による増幅 DNA 断片の検討

PCR による増幅 DNA 断片を AGE に供した結果、first PCR で約 650 bp の特異的な増幅 DNA 断片が得られたため、first PCR 産物を希釈無し、2 倍希釈、4 倍希釈と分け、それを鋳型として semi-nested PCR を行なったところ、Fig.18 が示すように全ての希釈倍率で約 600 bp 付近に特異的な増幅 DNA 断片が確認された。そこで、semi-nested PCR の約 600 bp の増幅 DNA 断片をアガロースゲルから抽出しクローニングした。

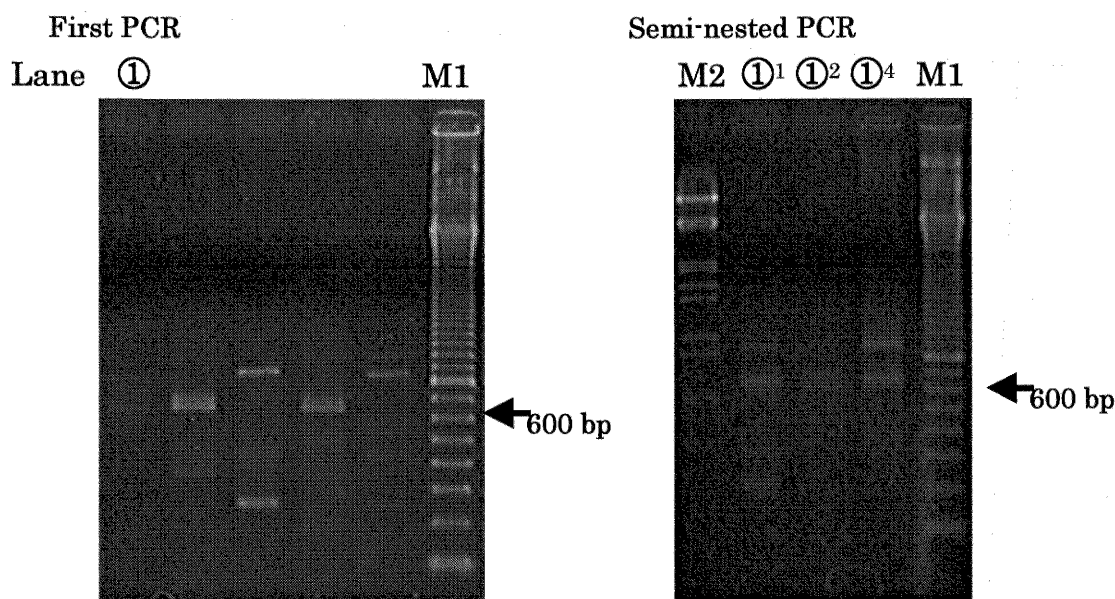


Fig.18. Agarose gel electrophoresis (1.2 %) of the 5'RACE products. M1, 100 bp DNA ladder; M2, λ /Hind III·EcoR I double digested marker; ①, first PCR products; ①¹, semi-nested PCR(first PCR products ① no dilution); ①², semi-nested PCR(first PCR products ① 2 × dilution); ①⁴, semi-nested PCR(first PCR products ① 4 × dilution).

② 形質転換菌のスクリーニング

実験方法（４）に従ってプラスミド DNA を調製した。その結果、Fig.19 のようにクローン ③に目的のサイズ（約 600 bp）の断片が含まれていることがわかった。

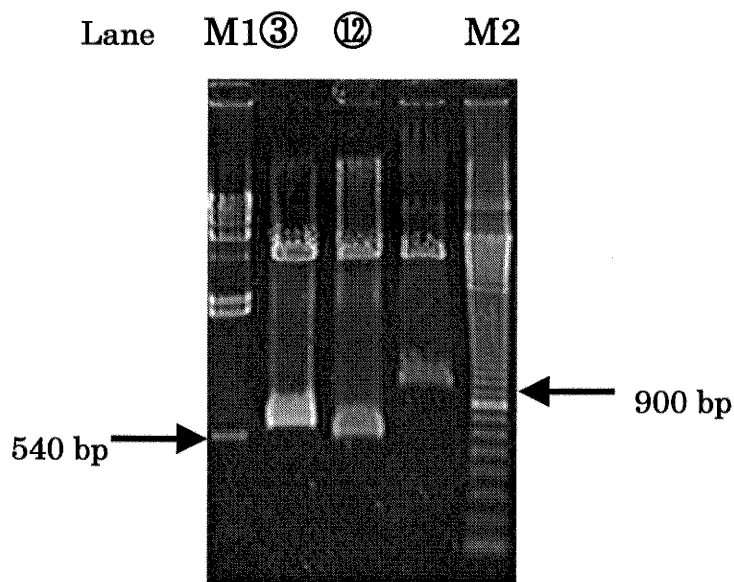


Fig.19. Preparation of plasmid DNA by alkali-SDS method for sequence. M1, λ /Hind III marker; ③,⑫, plasmid DNA digested by *EcoR* I; M2, 100 bp ladder. Clone numbers were indicated by numerals into circles.

③ 塩基配列の決定

実験方法（５）に従い、クローン化された 5'RACE 法による増幅 DNA 断片③及び⑫（Fig.18）を DNA シークエンサーに供し、塩基配列の決定を試みた。その結果 Fig.20 で示すように、クローン③では全長 608 bp のクローンが得られた。

```

1  ATACATGTAT ACATGTATAC ATGTATACAT GCCGGTCTTC CTGAACATCT GACCTCGTTG 60
61 CCTTCAGGAC GCGCTATAAA CCTGGGGCCG CTCTGCGAAA CAGAGTATTT TCTTCTGGAT 120
121 TCAGGTCCGC TGGTGTTTTC ATCATGAGGG TGTTTTTTGGC AGCGTTCGCG TTGTGCCTCA 180
181 GTGCAGTATT TGCTGCTCCA ACTTTGGACA AGCAGTTAGA CAACCATTGG GAACAGTGGA 240
241 AGAACTGGCA CGGTAAAAAA TACCATGAAA AGGAGGAGGG GTGGAGGCGA ATGGTGTGGG 300
301 AGAAAACTT GCAAAAGATC GAACTGCACA ATCTTGAGCA CTCCATGGGC ACACACACTT 360
361 ACAGACTCGG AATGAACCGC TTTGGTGATA TGACTCATGA GGAGTTCAGG CAGGTGATGA 420
421 ATGGCTACAA ACACAAGAAG GAGAGACGAT TCAGAGGATC TCTCTTCATG GAGCCCAACT 480
481 TCCTGGAGGT CCCAAACAGT TTGGACTGGA GAGAAAAGGG ATACGTGACT CCCGTGAAAG 540
541 ATCAGGGTGA GTGTGGTTCT TGCTGGGCCT TCAGCACTAC TGGAGCCATG GAGGGTCAGA 600
601 TGTTCAGG                                     608

```

Fig.20. Nucleotide sequence of 5'RACE products.

④ アミノ酸配列の推定

実験結果 2・(2)・③で得られた塩基配列から推定したアミノ酸配列を Fig.21 に示した。第 3 フレームに ORF が見られた。下線部で示した塩基配列が Fig.9 で示した RT-PCR で得られたクローンの塩基配列と一致し、 で囲んだアミノ酸配列が土井¹⁵⁾ がコイ肝臓より精製したカテプシン L の N 末端アミノ酸配列と一致した。これらのクローンは成熟型コイカテプシン L の N 末端を含む 5'末端配列であると断定した。

1	ATACATGTATACATGTATACATGTATACATGCCGGTCTTCCTGAACATCTGACCTCGTTG	60
61	CCTTCAGGACGCGCTATAAACCTGGGGCCGCTCTGCGAAACAGAGTATTTTCTTCTGGAT	120
121	TCAGGTCCGCTGGTGTTCATCATGAGGGTGTTCGAGCGTTCGCGTTGTGCCTCA	180
1	M R V F L A A F A L C L S	13
181	GTGCAGTATTTGCTGCTCCAACTTTGGACAAGCAGTTAGACAACCATTGGGAACAGTGGA	240
14	A V F A A P T L D K Q L D N H W E Q W K	33
241	AGAACTGGCACGGTAAAAAATACCATGAAAAGGAGGAGGGGTGGAGGCGAATGGTGTGGG	300
34	N W H G K K Y H E K E E G W R R M V W E	53
301	AGAAAACTTGCAAAAGATCGAACTGCACAATCTTGAGCACTCCATGGGCACACACTT	360
54	K N L Q K I E L H N L E H S M G T H T Y	73
361	ACAGACTCGGAATGAACCGCTTTGGTGATATGACTCATGAGGAGTTCAGGCAGGTGATGA	420
74	R L G M N R F G D M T H E E F R Q V M N	93
421	ATGGCTACAAACACAAGAAGGAGAGACGATTCAGAGGATCTCTTTCATGGAGCCCAACT	480
94	G Y K H K K E R R F R G S L F M E P N F	113
481	TCCTGGAGGTCCCAAACAGTTTGGACTGGAGAGAAAAGGGATACGTGACTCCCGTGAAAG	540
114	L E V P N S L D W R E K G Y V T P V K D	133
541	<u>ATCAGGGTGAGTGTGGTTCTTGCTGGGCCTTCAGCACTACTGGAGCCATGGAGGGTCAGA</u>	600
134	Q G E C G S C W A F S T T G A M E G Q M	153
601	<u>TGTTCAAGG</u>	608
154	F R	155

Fig.21. Nucleotide and deduced amino acid sequences of 5'RACE products. N-terminal amino acid sequences of the purified carp cathepsin L are boxed. Confirmed sequences of RT-PCR are underlined.

3. コイカテプシン L 遺伝子の全一次構造の決定

(1) コイカテプシン L 遺伝子の全塩基配列及び推定アミノ酸配列

RT-PCR, 5'RACE, 3'RACE 法の結果より、それぞれの増幅 DNA 断片の塩基配列を結合して得られたコイカテプシン L 遺伝子の全塩基配列及び、推定アミノ酸配列を Fig.22 に示した。コイカテプシン L 遺伝子の cDNA は 1,490 bp からなっていた。ORF は 1,011 bp と推定され、337 アミノ酸残基をコードしていた。また、土井¹⁵⁾ が精製したコイカテプシン L(活性型成熟酵素)から得られた N 末端アミノ酸配列のデータから、-Glu¹¹⁵-Val¹¹⁶-の間でプロセッシングを受け成熟型酵素になることが明らかになった。なお、推定分子量は不活性前駆体酵素では 38.5 kDa、成熟型酵素では 24.4 kDa で、既知のカテプシン L とほぼ同じであった。また、活性中心を形成する Cys¹⁴⁰, His²⁸⁰, Asn³⁰⁴ 及び、糖鎖結合推定部位の Asn²²⁴ の存在が確認された。

ところで、成熟型酵素の推定分子量 24.4 kDa は、土井¹⁵⁾ がコイ肝脾臓より、槌本¹²⁾ がコイ腹腔マクロファージより精製したカテプシン L の SDS-PAGE(SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)による推定分子量の約 28 kDa より低い値であったが、これは糖鎖の分子量が含まれていないためであると考えられる。

```

1 ATACATGTATACATGTATACATGTATACATGCCGGTCTTCCTGAACATCTGACCTCGTTG 60
61 CCTTCAGGACGCGCTATAAACCTGGGGCCGCTCTGCGAAACAGAGTATTTTCTTCTGGAT 120
121 TCAGGTCCGCTGGTGTTCATCATGAGGGTGTTCCTGGCAGCGTTCGCGTTGTGCCTCA 180
1 M R V F L A A F A L C L S 13
181 GTGCAGTATTTGCTGCTCCAACCTTTGGACAAGCAGTTAGACAACCATTGGGAACAGTGGA 240
14 A V F A A P T L D K Q L D N H W E Q W K 33
241 AGAACTGGCACGGTAAAAAATACCATGAAAAGGAGGAGGGGTGGAGGCGAATGGTGTGGG 300
34 N W H G K K Y H E K E E G W R R M V W E 53
301 AGAAAACTTGCAAAAGATCGAACTGCACAATCTTGAGCACTCCATGGGCACACACACTT 360
54 K N L Q K I E L H N L E H S M G T H T Y 73
361 ACAGACTCGGAATGAACCGCTTTGGTGATGACTCATGAGGAGTTCAGGCAGGTGATGA 420
74 R L G M N R F G D M T H E E F R Q V M N 93
421 ATGGCTACAAACACAAGAAGGAGAGACGATTCAGAGGATCTCTCTTCATGGAGCCCAACT 480
94 G Y K H K K E R R F R G S L F M E P N F 113
481 TCCTGGAGGTCCCAAACAGTTTGGACTGGAGAGAAAAGGGATACGTGACTCCCGTGAAAG 540
114 L E V P N S L D W R E K G Y V T P V K D 133
541 ATCAGGGTGAGTGTGGTTCTTGCTGGGCCCTTCAGCACTACTGGAGCCATGGAGGGTCAGA 600
334 Q G E C G S C W A F S T T G A M E G Q M 153
601 TGTTCAAGGAAGACAGGAAAAGTGGTGTCTCTGAGTGAGCAGAACCTGGTGGACTGCTCCC 660
154 F R K T G K L V S L S E Q N L V D C S R 173
661 GTCCTGAAGGCAACGAGGGCTGTAATGGAGGTCTAATGGACCAGGCTTTCAGTACATCA 720
174 P E G N E G C N G G L M D Q A F Q Y I K 193
721 AGGACCAGAACGGTCTGGACTCAGAGGAGTCTACCCCTATGTGGGAAGTGTATGATCAGC 780
194 D Q N G L D S E E S Y P Y V G T D D Q P 213
781 CCTGCCATTATGATCCCAAATACAGCGCAGCTAATGACACTGGATTCTGTTGACATTCCTCA 840
214 C H Y D P K Y S A A N D T G F V D I P S 233
841 GTGGAAGGAACATGCTCTGATGAAGGTATAGCTGCTGTGGGGCCAGTGTCTGTGGCTA 900
234 G K E H A L M K A I A A V G P V S V A I 253
901 TTGACGCCGGACACGAGTCTTTCCAGTTCTACCAGTCAGGCATCTACTATGAGAAAGAAT 960
254 D A G H E S F Q F Y Q S G I Y Y E K E C 273
961 GCAGCAGCGAGGAGCTAGATCATGGTGTGCTTGCCGTTGGTTATGGTTTTGAGGGTGAGG 1020
274 S S E E L D H G V L A V G Y G F E G E D 293
1021 ATGTTGATGGAAGAAGTATTGGATTGTCAAGAACAGCTGGAGTGAGAATTGGGGTGATA 1080
294 V D G K K Y W I V K N S W S E N W G D K 313
1081 AAGGTTATGTCTACATGGCCAAGGACAGACACAACCACTGTGGTATTGCTACAGCTGCTA 1140
314 G Y V Y M A K D R H N H C G I A T A A S 333
1141 GCTACCCCTCTCGTCTATAGAAGGATGCCTACAGTATCAAGACATAGTAGCAGAAGATCACA 1200
334 Y P L V * 337
1201 TTAGTGGTAACTGAAACCCACTAGTTTAGTGAGTAAGGAGTCACCTGACACGGGTGACT 1260
1261 GTGTCTCACAGCCTGACTGAGAGAAACCTCAAGCTCTAGATATTGTGTGACACTGTTTTA 1320
1321 GGGAATTTATGCAATTGTTTTTTTGGTTATTTTAATGCCGCTGATTTAGTTGATTTTTG 1380
1381 CCTCAATGTAAATACATATTCTTCAGTGTCTAAATGTACAAATGTGTTTTTATTATACA 1440
1441 TTCTGTATGATCAATAAAACTTTTTAAAAATTTAAAAAATTTAAAAAATTTAAAAAATTTAAAAA 1490

```

Fig.22. Nucleotide and deduced amino acid sequences of carp cathepsin L cDNA. N-terminal amino acid sequences of the purified carp cathepsin L are boxed. Three active sites (Cys, His, and Asn) are bold and underlined. N-glycosylation site (Asn) is italic and underlined. Initiation codon, stop codon, and the poly(A) signal sequences (**AATAAA**) are underlined.

(2) コイカテプシン L 遺伝子の完全長 cDNA のクローニング

Fig.22 で示した塩基配列がコイカテプシン L 遺伝子であることを証明するために、更にコイカテプシン L 遺伝子の完全長 cDNA のクローニングを行なった。方法は実験方法 (2) RT-PCR 法に準じて行なった。なお、使用したプライマーは開始 Met¹ を含む CATHL-NT(5'-ATGAGGGTGTTTTGGCAGCGTTCG-3')プライマー及び、実験方法 (3) ②で一本鎖 cDNA 合成時に使用した終止コドン部分を含む CL-6 プライマーを用いた。PCR の反応条件は実験方法 (4) RT-PCR 法と同様に行なった。その結果を Fig.23 に示した。約 1,000 bp に特異的な増幅 DNA 断片が検出されたため、この増幅 DNA 断片を TA クローニング法でクローニングし、アルカリ・SDS 法でプラスミド DNA を調製した後(Fig.23)、塩基配列を調べた。その結果、1,014 bp のクローンが得られ、そのクローンは Fig.24 が示すように Fig.22 に示した cDNA の塩基配列の 144-1157 に完全に一致していた。このことより Fig.22 に示した塩基配列はコイカテプシン L cDNA の配列であると断定した。

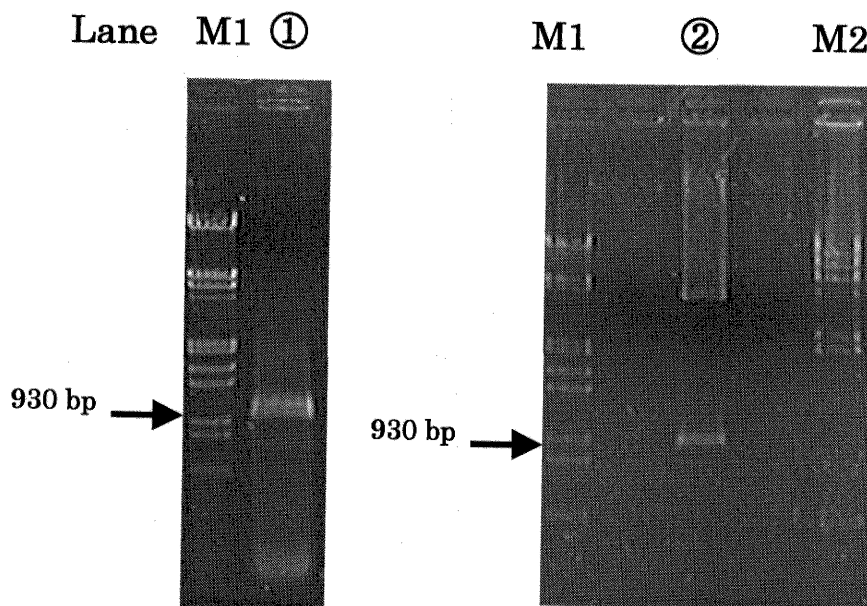


Fig.23. AGE of RT-PCR products and cloned complete full length cDNA of carp cathepsin L. Plasmid DNA digested by *EcoR* I. M1, λ *Hind* III/*EcoR* I double digested marker; ①, RT-PCR products(full length); ②, plasmid DNA(prepared by alkali-SDS method); M2, λ *Hind* III marker.

```

1  ATACATGTAT ACATGTATAC ATGTATACAT GCCGGTCTTC CTGAACATCT GACCTCGTTG 61
61 CCTTCAGGAC GCGCTATAAA CCTGGGGCCG CTCTGCGAAA CAGAGTATTT TCTTCTGGAT 120
121 TCAGGTCCGC TGGTGTTTTC ATCATGAGGG TGTTTTGGC AGCGTTCGCG TTGTGCCTCA 180
181 GTGCAGTATT TGCTGCTCCA ACTTTGGACA AGCAGTTAGA CAACCATGGG GAACAGTGGA 240
241 AGAACTGGCA CGGTAAAAAA TACCATGAAA AGGAGGAGGG GTGGAGGCGA ATGGTGTGGG 300
301 AGAAAACTT GCAAAAGATC GAACTGCACA ATCTTGAGCA CTCCATGGGC ACACACACTT 360
361 ACAGACTCGG AATGAACCGC TTTGGTGATA TGACTCATGA GGAGTTCAGG CAGGTGATGA 420
421 ATGGCTACAA ACACAAGAAG GAGAGACGAT TCAGAGGATC TCTCTTCATG GAGCCCAACT 480
481 TCCTGGAGGT CCCAAACAGT TTGGACTGGA GAGAAAAGGG ATACGTGACT CCCGTGAAAG 540
541 ATCAGGGTGA GTGTGGTTCT TGCTGGGCCT TCAGCACTAC TGGAGCCATG GAGGGTCAGA 600
601 TGTTCAGGAA GACCGGAAAA CTGGTGTCTC TGAGTGAGCA GAACCTGGT GACTGCTCCC 660
661 GTCCTGAAGG CAACGAGGGC TGTAATGGAG GTCTAATGGA CCAGGCTTTC CAGTACATCA 720
721 AGGACCAGAA CGGTCTGGAC TCAGAGGAGT CCTACCCCTA TGTGGGAACT GATGATCAGC 780
781 CCTGCCATTA TGATCCCAAA TACAGCGCAG CTAATGACAC TGGATTTCGT GACATTCCCA 840
841 GTGGAAGGA ACATGCTCTG ATGAAGGCTA TAGCTGCTGT GGGGCCAGTG TCTGTGCTA 900
901 TTGACGCCGG ACACGAGTCT TTCCAGTTCT ACCAGTCAGG CATCTACTAT GAGAAAGAAT 960
961 GCAGCAGCGA GGAGCTAGAT CATGGTGTGC TTGCCGTTGG TTATGGTTTT GAGGGTGAGG 1020
1021 ATGTTGATGG AAAGAAGTAT TGGATTGTCA AGAACAGCTG GAGTGAGAAT TGGGGTGATA 1080
1081 AAGGTTATGT CTACATGGCC AAGGACAGAC ACAACCACTG TGGTATTGCT ACAGCTGCTA 1140
1141 GCTACCCCTCT CGTCTAAGAA GGATGCCTAC AGTATCAAGA CATAGTAGCA GAAGATCACA 1200
1201 TTAGTGGTAA ACTGAAACCC ACTAGTTTAG TGAGTAAGGA GTCACCTGAC ACGGGTGACT 1260
1261 GTGTCTCACA GCCTGACTGA GAGAAACCTC AAGCTCTAGA TATTGTGTGA CACTGTTTTA 1320
1321 GGGAAATTTAT GCAATTGTTT TTTTGGTTA TTTTAATGCC GCTGATTAG TTGATTTTGT 1380
1381 CCTCAATGTA AATACATATT CTTCAGTGTC TAAATGTACA AATGTGTTTT TATTATACA 1440
1441 TTCTGTATGA TCAATAAAAC TTTTAAAAA TTTAAAAAA AAAAAAAAAA 1490

```

Fig.24. Nucleotide sequence of full length of carp cathepsin L cDNA. The sequence corresponded to ORF are shown underlined. The start codon(ATG) and the termination codon (TAA) are indicated by ATG and TAA.

考察及び小括

考察

カテプシン L に関する研究は、哺乳類を中心に進められており、酵素学的諸性質や、合成及び活性化機構が明らかとなっているが、1~8) 発現調節機構や生理的機能が完全に明らかにされているわけではない。一方、魚類においては報告例が少なく、その合成や活性化機構も明らかにされていない。そこで本研究では、それらを明らかにするための出発点として、遺伝子クローニングによるコイカテプシン L の全一次構造の決定を行なった。その際、出発材料としてゲノム DNA ではなく、mRNA を用いたのであるが、これはゲノム DNA と比べて、イントロン部分がなくコードしているアミノ酸配列の推定が容易であることと、適切なプロモーターを供給することによる発現系の構築が可能な点である。そこで本研究ではコイ肝臓より全 RNA を抽出精製し、それを出発材料として、RT-PCR、RACE 法による cDNA クローニング及び全一次構造の決定を行なった。

RT-PCR 法で用いたプライマーのうちアンチセンスプライマーである CAL-H は、既知の哺乳類カテプシン L の活性中心近傍での保存領域のアミノ酸配列に基づき作成したが、この活性中心近傍はその他のカテプシン群(システインプロテアーゼのパパインファミリーに属するカテプシン群、例えばカテプシン S、K、H)にも保存されており、それらの遺伝子クローニングにも有効であると思われる(実際に後の第五章でも使用した)。

5'RACE 法では、TdT 法で鋳型となる一本鎖 cDNA を合成した後、PCR のセンスプライマーにはポリ(A)に相補的なポリ(T)を持つプライマーを用いなければならなかった。A-T の水素結合は G-C の水素結合と比べて結合鎖が一つ少ない分結合も弱く、PCR での鋳型 DNA プライマーとのアニーリング温度をかなり低く設定しなければならない。アニーリング温度を下げればそれだけ非特異的な結合も増え、非特異的な増幅断片と目的の増幅断片との見極めが難しい。実際、温度条件などにより Fig. 21 のレーン番号の入れていないレーンの様に様々な断片が検出された。そのため semi-nested PCR 法を採用し、更により 5'末端に近いプライマーも作成し増幅断片の確認を行いクローニングした。本方法では TdT でポリ(A)を付加させたが、非特異的な増幅断片を少なくするためによりアニーリング温度を上げるためにポリ(C)を付加するなどの工夫が必要であると思われる。また、結果には示していないが、5'RACE 法で 5'非翻訳領域の途中に欠損が見られるクローン⑫(Fig. 19 参照)も得られた。このことは cDNA 合成時に mRNA が二次構造を取っていたために起きたミス、あるいはコイカテプシン L 遺伝子は何らかの外的因子による複数のスプライシングを受けるのかもしれない。しかし、この問題を解決するにはゲノム DNA からの解析が必要となる。本研究では、コイカテプシン L の全一次構造を決定することを目的としているため、この件に関してはまだ未検討である。今後の課題の一つとなろう。

コイカテプシン L cDNA は 1,490bp からなっていた。ORF は 1,011 bp と推測され、337

アミノ酸残基をコードしていた。推定分子量は不活性前駆体酵素では 38.5kDa、成熟型酵素では 24.4 kDa で、既知のカテプシン L とほぼ同じであった。また、活性中心を形成する Cys¹⁴⁰, His²⁸⁰, Asn³⁰⁴ 及び、糖鎖結合推定部位の Asn²²⁴ の存在が確認された。

また、コイカテプシン L 遺伝子の完全長 cDNA のクローニングを行い、RT-PCR, RACE 法で得られた PCR 産物により決定した塩基配列と完全に一致したことから Fig. 22 で示した塩基配列がコイカテプシン L 遺伝子であることが証明された。さらに、この Fig. 23 で示したコイカテプシン L 遺伝子の完全長 cDNA を用い大量発現系の構築が可能となった。

小括

1. コイカテプシン L 遺伝子の全一次構造を決定した。
2. コイカテプシン L cDNA は 1,490bp からなり、ORF は 1,011 bp と推測され、337 アミノ酸残基をコードしていた。
3. コイカテプシン L 遺伝子の完全長 cDNA のクローン化に成功したことにより、大量発現系の構築が可能となった。

第二章 コイカテブシン L と他起源由来カテブシン L との

比較生化学的研究

本章では、第一章で決定したコイカテブシン L の全一次構造と他起源由来カテブシン L との比較を行い、一次構造レベルで比較生化学的に解析を行った。

哺乳類においては、成熟型のカテブシン L は重鎖と軽鎖にプロセッシングを受け、お互い S-S 結合することによって、安定な形になることが知られている。^{1,3,8)} 一方、コイでは土井¹⁵⁾ の報告により精製酵素を SDS-PAGE に供した結果、two-chain form を取らないことを示唆するデータが得られている。また、Yamashita らはシロサケにおいて同様の報告をしている。¹²⁾ しかしながら、一次構造レベルでのそれらの知見はない。

本研究では、コイカテブシン L の全一次構造と他起源カテブシン L とを比較することによって、構造的な違いを明らかにした。

解析結果

1. 他起源由来カテプシン L とのアミノ酸配列の相同性の比較

第一章実験結果 3-(1)で決定したコイカテプシン L とニジマス、¹⁸⁾ ゼブラフィッシュ、¹⁷⁾ マウス、¹⁹⁾ ラット、⁵⁾ ヒト、⁶⁾ ウシ (GenBank Accession No. 91755)カテプシン L のアミノ酸配列の相同性を比較し Fig.25 に示した。カテプシン L の活性基として報告されている Cys、His、Asn 及び糖鎖結合部位と推定されている Asn は既知のカテプシン L とほぼ同じ位置に保存されていた(Fig.25)。これらの残基の近傍のアミノ酸配列は、Cys¹⁴⁰ を中心とした 8 残基、His²⁸⁰ の C 末端側 8 残基、Asn³⁰⁴ の前後 3 残基の相同性は非常に高かった。また、Asn²²⁴ の C 末端側 8 残基もゼブラフィッシュを除く全種で保存されていた。これらの部位はカテプシン L の構造上重要な部分であると推測される。また、ラット^{2,5)} のカテプシン L のプレ・プロ部におけるプロセッシング部位より、-Ala¹⁷-Ala¹⁸-の間でプロセッシングを受けプロ型酵素になると推測される。

		Arrow 1			
CcCL	1	MR-VFLAALCLSAVFA	A	PTLDKQLDNHWEQWKNWHGKKYHEKEEGWRRMVWEKNLQKI	59
OmCL	1	.TALY..VLV..V...C	.	.RF.S..ED..HL.....H...S.....K..	60
DrCL	1	.M--.ALLVT.YI....	.	.SI.I...D..NS..SQ...S...DV.VG...I....R..	58
MmCL	1	.-NLL.LLAV...GTAL	T	.KF.QTFSAE.HQ..ST.RRL.GTN..E...AI..K.MRI.	59
RnCL	1	.-TPL.LLAV...GTAL	T	.KF.QTFNAQ.HQ..ST.RRL.GTN..E...A....MRM.	59
HsCL	1	.-NPT.ILA.F.GIAS.	T	TF.HS.EAQ.TK..AM.NRL.GMN.....A....MKM.	59
BtCL	1	.-NPSFFLTV...GVAS	.	.KL.PN..A..HQ..AT.RRL.GMN..E...A....KKI.	59
consensus	*			* * * * *	
		Arrow 2			
CcCL	60	ELHNLEHSMGTHTYRL	G	MNRFGDMTHEEFRQVMNGYKHKKERRFRGSLFMEPNFLEVPNS	119
OmCL	61	.I.....T..K.S.....	HN.....T.....QT..K.K.....Y.QA.KA	120
DrCL	59	.Q..F.Y.Y.N..FKM...	QN.....A....T.DPNQTSQ.P.....S.FAA.QQ	118
MmCL	60	Q...G.Y.N.Q.GFSME..	AN.....V...R.Q.HKK--.R..Q..LM.KI..K.	117
RnCL	60	Q...G.Y.N.K.GFTME..	AN.....IV...R.Q.HKK--.R..Q..LM.QI..KT	117
HsCL	60Q.YRE.K.SFTMA..	AS.....FQNR.P.K--.KV.Q..L.Y.A.R.	117
BtCL	60	D...Q.Y.E.K.AF.MA..	AN.....FQNQ.HKK--.K..H..LLVD..K.	117
consensus	** *	*	*	* * * *	
CcCL	120	LDWREKGYVTPVKDQGE	C	SCWAFSTTGAMEGQMFRKTGKLVSLSEQNLVDCSRPEGNEG	179
OmCL	121	V.....S.....Q.....			180
DrCL	119	V...QR.....KQ.....	S	..S...L...L.....I.M.....Q..Q.	178
MmCL	118	V.....C.....N..Q.....	A	S..CL....L....I.....HAQ..Q.	177
RnCL	118	V.....C.....N..Q.....	A	S..CL....L....I.....HDQ..Q.	177
HsCL	118	V.....Y.....N..Q.....	A	..L.....R.I.....G.Q...	177
BtCL	118	V..TK.....N..Q.....	A	..L.....AQ..Q.	177
consensus	**	*	*	* * * * *	
CcCL	180	CNGGLMDQAFQYIKDQNG	L	DSEESYPVGTDDQPCHYDPKYSAANDTGFDIPSGKEHAL	239
OmCL	181Q.NA...T.....	E	D...K.EF...E.....M	240
DrCL	179V.ENK.....Q....	L	A.R...RFNV.KI.....N.L..	238
MmCL	178F.....ENG.....	E	A-K.GS.K.RAEFAV...-QQ.K..	235
RnCL	178F.....ENG.....	E	A-K.GS.K.RAE.AV...-QQ.K..	235
HsCL	178Y...VQ.NG.....	E	A.E-ES.K.N...V...-KQ.K..	235
BtCL	178N.....NG.....	L	A..TNS.N.K..C...-QR.K..	236
consensus	*****	*****	*	* * * * *	
CcCL	240	MKAIAAVGPVSVAIDAG	H	ESFQFYQSGIYYEKECSSEELDHGVLA	299
OmCL	241	...V.....V.....			300
DrCL	239	.N.V.....S.Q.L.....	R	A...SR...A.V...YQ.A.A.NR.	298
MmCL	236	...V.T...I...M..S.P.L..	SPN...KN...L...Y..T.SNKN..	295
RnCL	236	..PV.T...I...M..S.P.L..	SPN...KD...V...Y..T.SNKD..	295
HsCL	236	...V.T...I.....L..KE...	F	PD...DM...V.....STES.NN..	295
BtCL	237	...V.T...I.....T....K....	D	PD..CKD...V.....T.SNNN.F	296
consensus	*	*	*	* * * * *	
CcCL	300	WIVKNSWSENWGD	K	GYVMAKDRHNHCGIATAASYPLV-	337
OmCL	301K.....I.....K.....	S-	338
DrCL	299DK.....I.....KN...	V	.K....M-	336
MmCL	296	.L...GSE..M...IKI...D...	LV.N	334
RnCL	296	.L...GKE..MD..IKI...N...	LI.N	334
HsCL	296	.L...G.E..MG.....R.....S.....	T	.-	333
BtCL	297GPE..WN.....QN.....T.....	T	.-	334
consensus	*	*	*	* * * * *	
		Arrow 3			

Fig. 25. Comparison of the amino acid sequences of carp and other cathepsin Ls. CcCL; carp cathepsin L, OmCL; rainbow trout, DrCL, zebrafish, MmCL; mouse, RnCL; rat, HsCL; human, BtCL; bovine. Dots mean identical with carp cathepsin L. Generally conserved sequences within cathepsin Ls are indicated by asterisks. Three active sites (Cys, His, and Asn) are bold and underlined. N-glycosylation site (Asn) is underlined. Putative cleavage sites between signal peptides and proenzymes, proenzymes and mature enzymes, and single-chain to two-chain forms are indicated by arrows (1, 2, 3), respectively. The mature form is boxed.

哺乳類においては、カテプシン L は Fig.26 に示す通り、まずプレ部がプロセッシングを受け、プロ型の不活性前駆体酵素となる。^{1,2)} 次いで、自己分解²⁰⁾あるいはメタロエンドペプチダーゼ⁸⁾によってプロ部がプロセッシングを受け、成熟型酵素となる。⁸⁾ 更に、システインプロテアーゼによって速やかに single-chain form (29 kDa) から重鎖 (23 kDa) と軽鎖 (6 kDa) が S-S 結合でつながった two-chain form へとプロセッシングされ、安定な成熟型酵素へと変化する。^{1,3,8,21)}

一方、魚類においては、two-chain form を取るという報告はなく、哺乳類と同様な活性化機構であるかまだ明らかにされていない。そこで、プロセッシング部位近傍の配列についてアミノ酸レベルでの解析を行なった。

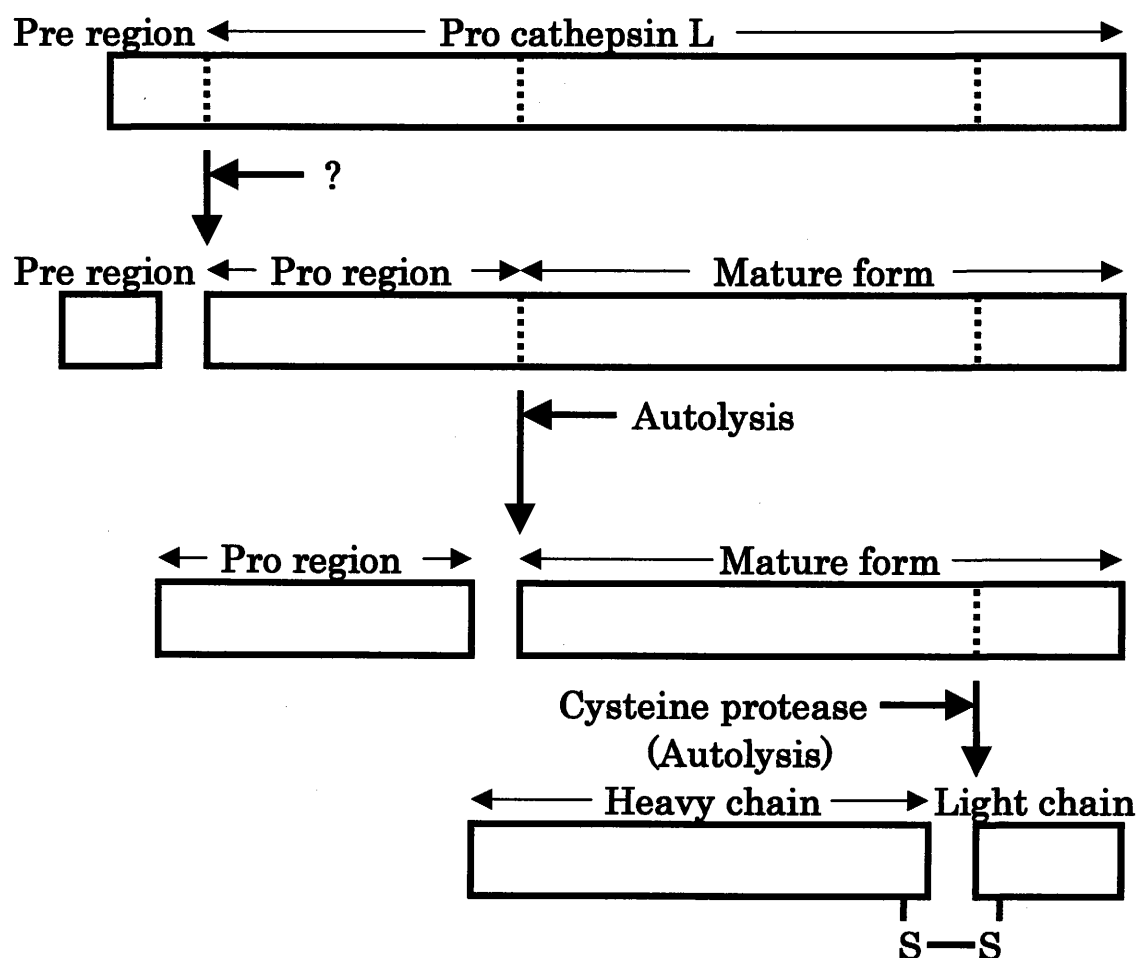


Fig.26. Processing mechanism of mammalian cathepsin L

プレ部とプロ型酵素とのプロセッシング部位近傍においては、コイとその他既知のカテプシン L との間の相同性は低かった。しかし、Fig.27 に示すようにラット^{2,5)} で報告されているプロセッシング部位直前のアミノ酸 (P1 部位) の Ala は種間を超えて保存されていた。

		Pre region	←→	Pro region
Carp	1	MR-VFLAAFA	↓	LCLSAVFAAPTLD 22
Rainbow trout	1	MTALYLAVLVLCV		SAVCAAPRFD 23
Zebrafish	1	MM--FALLVTLYIS		SAVFAAPSID 21
Mouse	1	M-NLLLLLAVL		LCLGTALATPKFD 22
Rat	1	M-TPLLLLAVL		LCLGTALATPKFD 22
Human	1	M-NPTLILAAFA		CLGIASATLTFD 22
Bovine	1	M-NPSFFLTVL		LCLGVASAAPKLD 22

Fig.27. Comparison of processing site of pre region and pro region of between carp cathepsin L and other cathepsin Ls. Identical amino acids with carp cathepsin L are red letters.

プロ部と成熟型酵素とのプロセッシング部位^{5-8,15)} 近傍の相同性はあまり高くなかったが、成熟型酵素の N 末端から 2 番目の Pro は全種で保存されていた(Fig.28)。

		Pro region	↔	Mature form	
Carp	105	GSLFMEPNFLEVPNSLDWREKG			126
Rainbow trout	106	GSLFMEPNYLQAPKAVDWREKG			127
Zebrafish	104	GPLFMEPSFFAAPQQVDWRQRG			125
Mouse	103	GRLFQEPLMLKIPKSVDWREKG			124
Rat	103	GRLFQEPLMLQIPKTVDWREKG			124
Human	103	GKVFQEPLFYEAPRSVDWREKG			124
Bovine	103	GKLFHEPLLVDVPKSVDWTKKG			124

Fig.28. Comparison of processing site of pro region and mature form of between carp cathepsin L and other cathepsin Ls. Identical amino acids with carp cathepsin L are red letters.

次に、哺乳類における two-chain form になる切断部位近傍においては、魚類と哺乳類とに明らかな違いが見られた。Fig.29 に示すように哺乳類においては切断部位の直前のアミノ酸(P1 部位)は親水性アミノ酸である Ser^{5,6)} であるのに対して、魚類では疎水性アミノ酸である Val になっていた。また、この近傍のアミノ酸配列の相同性は低かった。そのため魚類では two-chain form を取らないことが示唆された。この点が魚類カテプシン L と哺乳類カテプシン L との大きな違いである。当研究室の土井は精製酵素での SDS-PAGE により、¹⁵⁾ 植本¹³⁾ は、コイカテプシン L に対する特異抗体を用いたイムノブロッティングの結果から、コイカテプシン L は two-chain form を取らないのではないかと報告している。今回、遺伝子側からもコイのカテプシン L は two-chain form を取らない可能性を示唆するデータが得られた。

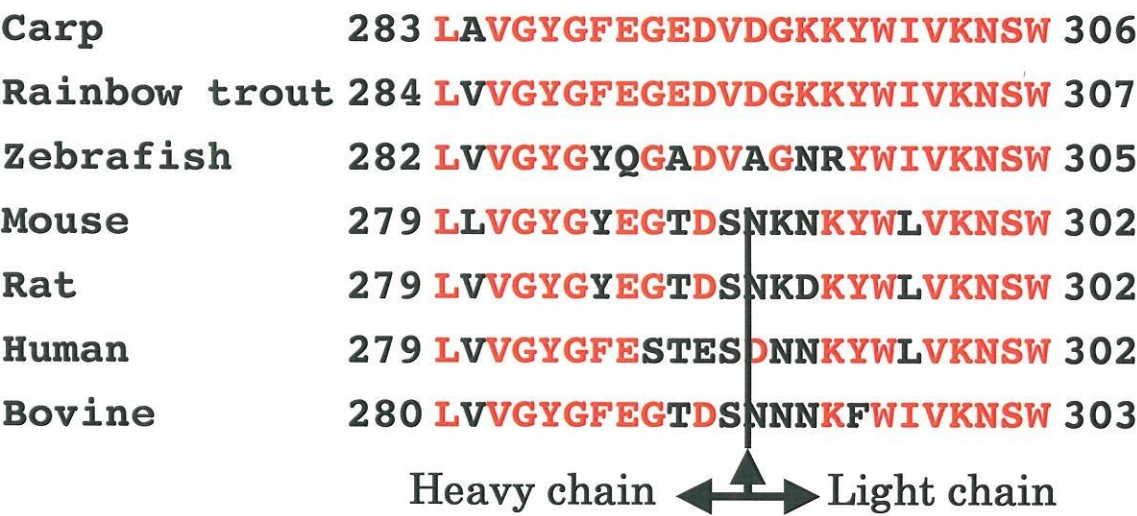


Fig.29. Comparison of the conversion from the single chain forms to the two chain forms. Identical amino acids with carp cathepsin L are red letters.

次に、カテプシン L のプレ・プロ部、成熟型酵素及び全アミノ酸配列の相同性 (%) を求め Table 1 に示した。ニジマス、ゼブラフィッシュ及び哺乳類のカテプシン L との全アミノ酸配列の相同性は 62~83% であった。そのうち成熟型酵素では 69~89%、プレ・プロ部においては 45~71% の相同性が認められた。特にニジマスとはかなり高い相同性が見られた。また、哺乳類カテプシン L の two-chain form における軽鎖のアミノ酸配列との相同性も比較したが、成熟型酵素とほぼ同じ程度の相同性を示した。

Table 1 . Scheme of amino acid sequence homologies among cathepsin Ls. Numerical values are expressed as percentage of identical amino acid residues.

Pre-pro cathepsin L						
	Rainbow trout	Zebrafish	Mouse	Rat	Human	Bovine
<u>Carp</u>	<u>82.8</u>	<u>68.4</u>	<u>62.0</u>	<u>61.7</u>	<u>66.9</u>	<u>68.9</u>
Rainbow trout		67.3	61.3	62.2	65.2	67.0
Zebrafish			61.2	61.1	58.2	61.8
Mouse				93.7	71.8	76.0
Rat					73.0	75.7
Human						76.9

Mature cathepsin L						
	Rainbow trout	Zebrafish	Mouse	Rat	Human	Bovine
<u>Carp</u>	<u>89.2</u>	<u>73.8</u>	<u>69.4</u>	<u>68.9</u>	<u>75.1</u>	<u>75.7</u>
Rainbow trout		73.9	69.1	68.6	73.9	74.8
Zebrafish			69.2	68.8	66.8	69.9
Mouse				95.0	78.1	79.6
Rat					78.1	79.2
Human						81.4

Pre-pro region						
	Rainbow trout	Zebrafish	Mouse	Rat	Human	Bovine
<u>Carp</u>	<u>70.7</u>	<u>58.9</u>	<u>48.2</u>	<u>47.8</u>	<u>51.3</u>	<u>54.7</u>
Rainbow trout		54.7	46.6	50.0	48.7	52.1
Zebrafish			47.7	48.1	41.3	48.1
Mouse				91.2	61.8	69.6
Rat					63.7	69.0
Human						69.0

Light chain						
	Rainbow trout	Zebrafish	Mouse	Rat	Human	Bovine
<u>Carp</u>	<u>90.7</u>	<u>76.2</u>	<u>68.3</u>	<u>70.0</u>	<u>75.6</u>	<u>69.8</u>
Rainbow trout		76.7	65.9	63.6	72.1	65.1
Zebrafish			63.4	63.4	64.1	69.2
Mouse				88.6	78.6	72.1
Rat					76.2	72.1
Human						81.0

2. 親水性・疎水性プロットによるプレ・プロ部の比較

プレ・プロ部に関しては種間でアミノ酸配列はあまり保存されていなかったもので、その領域についてアミノ酸の親水性・疎水性という性質に注目し、Hopp & Woods²²⁾の方法に基づき親水性・疎水性プロットを作成した。その結果を Fig.30 に示す。プレ部は全種共通に疎水性アミノ酸で構成されていることがわかった。一般的に、タンパク質の膜透過のためのシグナルペプチド部は、その中央に5～10残基の疎水性アミノ酸を含む特徴があり、²³⁾本研究のコイカテプシン L のプレ部の場合も他起源のカテプシン L と同様の特徴を有していたので、このプレ部が、小胞体輸送型のシグナルペプチドであることが示唆された。

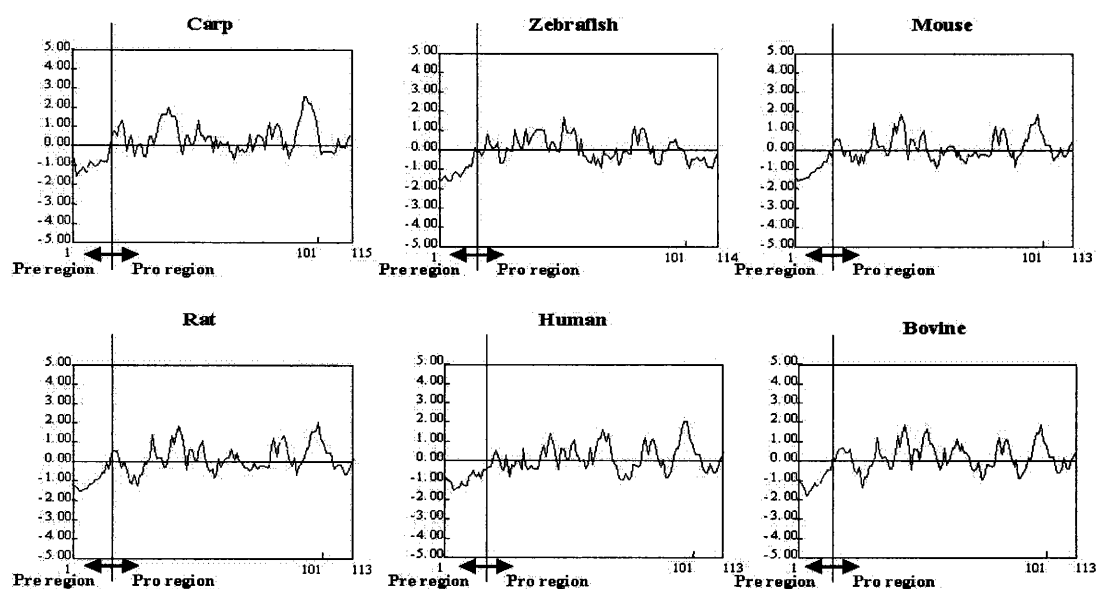


Fig.30. Hydrophobicity plot of pre-pro region of cathepsin L. In the vertical axis, hydrophilic amino acids are upper and hydrophobic amino acids are lower. In the horizontal numericals are showed amino acids number.

考察と小括

考察

本研究では第一章で決定したコイカテプシン L と他起源カテプシン L とを比較生化学的観点から調べることにより、魚類と哺乳類カテプシン L との構造的な違いを研究した。

既知のカテプシン L と比較して、アミノ酸配列のレベルでは、成熟型酵素>プロ部>プレ部の順に相同性が高く、特に成熟型酵素においては、活性中心の Cys、His、Asn 及び糖鎖結合推定部位の Asn といった構造上重要な部位近傍においてかなり保存されていた。しかし、哺乳類では成熟型酵素において重鎖と軽鎖にプロセッシングを受け、お互い S-S 結合することによって、安定な形をとることが知られている。^{1,3,8)} 一方、コイでは土井¹⁵⁾ の精製酵素での SDS-PAGE、及び槌本¹³⁾ のイムノブロッティングによる報告において、two-chain form を取らないことを示唆するデータが得られているが、今回一次構造レベルで比較した結果、コイ、ニジマス、ゼブラフィッシュ共に、哺乳類における two-chain form になる切断部位の直前のアミノ酸(P1 部位)が親水性アミノ酸である Ser から疎水性アミノ酸である Val になっていた。また、この近傍のアミノ酸配列の相同性は低かった。以上のことより、魚類と哺乳類カテプシン L 間では重鎖・軽鎖の切断部位近傍の配列が保存されていないことが明らかになった。一方、コイとニジマスにおいてはかなり保存されていた。Yamashita ら¹²⁾ はシロサケカテプシン L によるウシのインスリン B 鎖の加水分解の結果により P1 部位が Val の場合作用しないと報告している。このことにより、魚類カテプシン L は two-chain form を取らない可能性が強く示唆された。次いで、哺乳類カテプシン L において軽鎖に相当する領域のアミノ酸配列レベルでの相同性を比較した。その結果、成熟型酵素全ての領域の相同性とあまり変わり無く、プレ・プロ部より相同性が高いことわかった。そこでこの領域において親水性・疎水性プロットを作成し比較してみたところ、データとしては記述していないが、どの種も類似したパターンを示し、中心部は親水性アミノ酸で構成されているのに対して、N 末端近傍及び C 末端近傍は疎水性アミノ酸で構成されていた。そのため構造が保たれていることが推測される。最近、組換え体でのカテプシン L の X 線構造解析が哺乳類を中心に進められているが、現時点では詳細は不明である。コイカテプシン L の X 線構造解析はカテプシン L の系統進化を知る上で今後の課題の一つとなろう。また、なぜ分子構造において違いが起きたのか、筆者が推測するには、元々は two-chain form を取らないでも機能していたのだろう。しかし陸上では気圧や酸素の影響あるいは温血動物に進化することによって、two-chain form を取ったほうが安定になった、あるいは水中より紫外線の影響を直接受けやすいため、現在陸上に生息する脊椎動物の共通の祖先に突然変異が生じ、two-chain form を取るようになったと考えている。両生類のアフリカツメガエル *Xenopus laevis* (GenBank Accession No. Y 15901.) では、哺乳類カテプシン L の重鎖に相当する領域の C 末端アミノ酸が、コイやニジマスと同様に疎水性ア

ミノ酸の Val になっており、two-chain form を取らない可能性が示唆される。一方、鳥類ではニワトリカテプシン L²⁴⁾ が SDS-PAGE より two-chain form を取ることがわかっているが、single-chain form が two-chain form になる切断部位近傍のアミノ酸配列はまだ未決定である。最近、p41 タンパクの変異体の TG ドメインが哺乳類カテプシン L の two-chain form の安定化に重要な働きを持つという報告がある。²⁵⁾ 一方、魚類においては p41 様タンパクの遺伝子クローニングがゼブラフィッシュで報告されているが、その機能については全く不明である。²⁶⁾ 多くの生物種のカテプシン L の一次構造のデータが蓄積されれば、カテプシン L の系統進化のメカニズムも明らかとなっていくであろう。

一方、プレ・プロ部では推測されるプロセッシング部位において、プレ部に 2 つの共通点が見出された(Fig. 27)。第一にプレ部の C 末端において哺乳類カテプシン L,B,H に共通して保存されている Ala の存在である。これは、カテプシン群に共通して保存されているものと思われる。第二にプレ部は多数の疎水性アミノ酸で構成されているということである。小胞体に輸送される酵素も含めたタンパク質のシグナルペプチドにはその中央に 5~10 の疎水性アミノ酸残基を含むという特徴があり、哺乳類のカテプシン L,B,H ではこの特徴が確認されている。本研究でも、親水性・疎水性プロットの結果から、プレ部は小胞体輸送型のシグナルペプチドの存在が確認された。

小括

1. 中心付近は種間を越えてよく保存されていたが、特に魚類間の相同性が高かった。
2. 哺乳類における two-chain form になる P1 部位が親水性アミノ酸である Ser から疎水性アミノ酸である Val になっていた。そのため魚類では single-chain form のままであることが示唆された。
3. プレ部は多数の疎水性アミノ酸で構成されておりシグナルペプチドとしての役割が示唆された。

第三章 コイカテプシン L の大量発現系の構築に関する研究

本研究では第一章で得られたコイカテプシン L 遺伝子の完全長 cDNA を用いポリヒスチジン(6×His tag)融合タンパク質発現系による大腸菌での大量発現系の構築を行った。また発現酵素を用いた特異抗体の作製及び発現酵素による自己触媒的活性化機構についての研究を行った。

組換え体による大量発現系が構築できれば、精製酵素では困難な大量精製が可能となり、発現酵素により作製した特異抗体を用いることにより、*in vivo* での様々な情報を得ることができる。6×His tag 融合タンパク質発現系を用いたのは Fig.31 に示す通り発現用ベクターのマルチクロニングサイトの 5'末端に 6 個のヒスチジンのコドンがある。マルチクロニングサイトに目的の遺伝子を組込めば、N 末端に 6 個のヒスチジンを含む融合タンパク質が得られる。中性溶液中で 6 個のヒスチジンは強い塩基性を示しニッケルカラムに結合することが知られている。また、この結合はイミダゾールを添加することにより競争的にはずす事ができ、簡単に目的の融合タンパクの精製が可能である。また宿主大腸菌が限定されたり、他の融合タンパク質発現系より精製度が低いなどの欠点もあるが、His tag の部分が小さく、発現酵素の酵素活性や免疫抗原性の影響が小さいなどの利点がある。

今回は、His tag 融合タンパク質発現系にてコイカテプシン L の大量発現を行い、得られた発現酵素を用いコイカテプシン L の自己触媒的活性化を *in vitro* で行い、two-chain form を取らないことを確認することを目的とした。

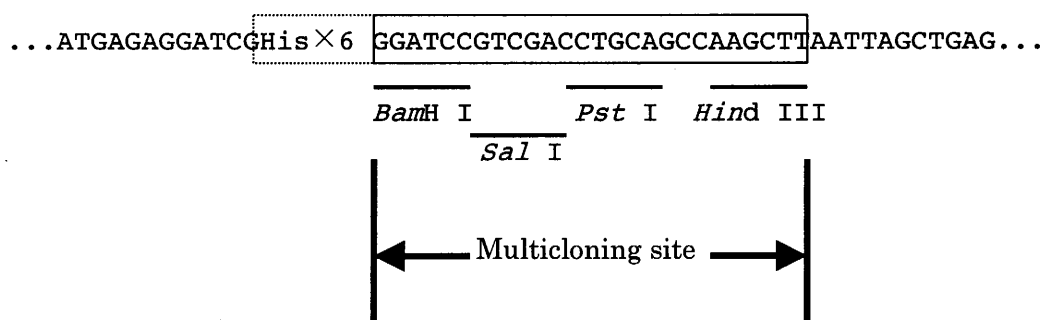


Fig. 31. Nucleotide sequence of multiconing site on pQE-9 expression vector.

実験方法

1. 実験用試薬及び機器

遺伝子クローニングに使用した試薬及び機器は第一章と同様のものを用いた。Tween-20(ICN biomedical 社製)以外の試薬には特記しない限り和光純薬工業社製の特級試薬を用いた。発現用ベクターには pQE-9 ベクター(QIAGEN 社製)を用い、発現タンパク質の精製には TALONspin™ Column (Clontech 社製)を用いた。カテプシン L の基質にはカルボベンゾキシ-L-フェニルアラニル-L-アルギニル-7-(4-メチル)クマリルアミド (Z-Phe-Arg-MCA)(ペプチド研究所製)を用いた。蛍光光度計には FP-700(JASCO 社製)を用いた。酵素の濃縮には Centricon YM-10 (Amicon 社製)を用いた。イムノブロッティングにはタンパク質転写膜(Transfer-blot Transfer Medium)、濾紙、ホライズプロット装置及び定電圧装置 CROSS POWER150(ATTO 社製)を用いた。抗原抗体反応検出時の二次抗体には Peroxidase conjugated goat anti-rat IgG, Peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (Organ Technika 社製)を用い、その検出には Konica Immunostaining HRP-1,000 (コニカ 社製)を用いた。N 末端アミノ酸配列分析には Immobilon™-PSQ Transfer Membrane (PVDF)(MILLIPORE 社製)及び自動エドマン分解装置 Procise™ 492 プロテインシーケンサー(Applied Biosystems 社製)を用いた。タンパク質の定量には、Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit (PIRCE 社製)と牛血清アルブミン(BSA)(和光純薬工業社製)を用いた。

2. 実験方法

(1) 酵素活性の測定

0.1 M Sodium acetate buffer containing 1 mM EDTA, pH 5.5	730 µl
40 mM Cysteine	50 µl
Enzyme solution	20 µl
<hr/>	
Total	800 µl

以上のように反応液を調整し、37℃、1 分間のプレインキュベーションの後、125 µM の蛍光合成基質 Z-Phe-Arg-MCA 20 µl を加え、この反応液を 37℃で 10 分間の反応を行った。反応停止には、反応停止液(30 mM Sodium acetate, 100 mM Sodium monochloro acetate, 0.4 % acetic acid) 1.5 ml を用いた。活性測定には蛍光光度計を用い、酵素反応液 2.5 ml を Ex=380 nm, Em=450 nm の条件で測定した。酵素活性は一分間あたり 1 µM の AMC を遊離する力価を 1 単位(1 U)とした。

(2) タンパク質の定量

タンパク質の定量には Micro BCA 法を用いた。Micro BCA™ Reagent C(MC) 0.2 ml と Micro BCA™ Reagent (MB) 4.8 ml をよく混合し、更に Micro BCA™ Reagent C(MA) 5 ml を加えてよく混合する。この溶液 1 ml に試料 10 µl を加えて、60℃で 1 時間インキュベーションする。インキュベーション後反応液の 562 nm における吸光度を測定する。なお

測定の度に 200 µg/ml の BSA 10 µl とブランクを同様に発色させ、標準曲線を作成した。

(3) SDS-PAGE

SDS-PAGE には Laemmli の方法²⁷⁾に従い、スラブゲルを用いて行った。ゲルは所定の方法に従い 12.5 %の単一ゲルを作成し用いた。ゲルの染色には、クマシーブリリアントブルー(CBB) R-250 を用いて行った。分子量測定用の標準タンパク質には SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (Bio-Rad 社製)、SDS-PAGE 用プレステインドタンパク質マーカー(Low range)(ナカライテスク社製)を用いた。

(4) イムノブロットング法

試料を 12.5 % SDS-PAGE に供し、ブロットング装置にて、10-12 mA で 90 分間通電して転写膜に転写した。転写膜を 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5(TBS)で洗浄後、3 %ゼラチンを含む TBS でブロッッキングした。TBS、0.1 % Tween®-20(TTBS)で洗浄後、一次抗体(Anti carp cathepsin L rat IgG、もしくは Anti carp cathepsin L rabbit IgG)と室温で一晩反応させた。TTBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体(Peroxidase conjugated goat anti-rat IgG、もしくは Peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG)と室温で 60 分間反応させた。TTBS 及び 20 mM リン酸緩衝液、145 mM NaCl, pH 7.0 で洗浄を行ってからコニカイムノステインで発色させた。

(5) N 末端アミノ酸配列の決定

試料を SDS-PAGE に供したのち、PVDF 膜に転写後、プロテインシーケンサーに供し精製酵素の N 末端アミノ酸配列を決定した。

(6) 6×His tag 融合タンパク質発現系の構築

① pQE-9 発現用ベクターへの組み込み

プライマーにはコイカテプシン L 遺伝子ではなくマルチクローニングサイトにある制限酵素サイトを付加した開始コドンを含み制限酵素サイト *Bam*H I を付加したプライマー Cath.L-B (5'-GGATCCATGAGGGTGTGTTTTGGCAGGGTTC-3')と終始コドンを含み制限酵素 *Hind* III サイトを付加したプライマーCath.L-H (5'-AAGCTTTTAGACGAGAGGGTAGCTAGCAGC-3')を用い、第一章でクローン化したコイカテプシン L の完全長 cDNA を持つプラスミドを鋳型に第一章 3. 実験方法 (2) RT-PCR と同じ反応条件で PCR 法を行った。その後 TA クローニング法により第一章 3. 実験方法 (4) と同様の方法でプラスミドにコイカテプシン L 遺伝子を挿入し、調製した。調製したプラスミドを制限酵素 *Bam*H I と *Hind* III で消化後、カテプシン L 遺伝子を抽出精製した。その後、制限酵素 *Bam*H I と *Hind* III で消化した発現用ベクターpQE-9 にカテプシン L 遺伝子を連結した。カテプシン L 遺伝子を連結した pQE-9 ベクターは、大腸菌 JM109 に形質転換した後、alkali-SDS 法で調製し、DNA シーケンサーにてコイカテプシン L 遺伝子が組み込まれているか確認した。

② 6×His tag 融合コイカテプシン L の誘導発現

組換え体の形質転換菌を 5 ml の 0.0005 %アンピシリンを含む LB 培地 にて一晩 37℃で一晩振盪培養し、これを種菌として、40 ml の 0.0005 %アンピシリンを含む LB 培地にて

80 rpm, 30℃で $OD_{600} \leq 0.8$ になるまで振盪培養した。その後、100 mM IPTG (終濃度 0.25 mM) を加えた後、80 rpm, 30℃で 4 時間、誘導発現させた。集菌後、2 ml の 300 mM NaCl を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液に懸濁後、水中にて超音波破碎(150 W, 10 秒 \times 3 回)を行った。遠心分離後、Denaturing Extraction/Wash Buffer (pH 7.0)(50 mM リン酸ナトリウム、6 M グアニジン塩酸塩、300 mM NaCl)で可溶化し遠心分離後の上清をニッケル結合樹脂カラム(TALONspin™ Column)に供した。吸着タンパク質を Denaturing Elution Buffer (pH 7.0)(45 mM リン酸ナトリウム、5.4 M グアニジン塩酸塩、270 mM NaCl, 150 mM イミダゾール(キシダ化学社製))で溶出後、50 mM トリス・塩酸緩衝液(pH 8.0)、6 M 尿素、3 mM EDTA を含む Denaturing Extraction/Wash Buffer で可溶化し、0.1 M トリス・塩酸緩衝液(pH 8.6)、0.015 % Triton X-100、3 mM システイン、0.1 mM シスチンで一晩透析した。得られた酵素液を実験に用いた。

(7) 6×His tag 融合プロカテプシン L の自己触媒的活性化の検討

コイカテプシン L は不活性前駆体から成熟型酵素に変換する際、自己触媒的に活性化することが知られている。²⁰⁾ その性質を利用して、得られた 6×His tag 融合プロカテプシン L の活性化を行った。なお処理方法は、以下の 2 種類で行った。

① 緩衝液の pH のみを下げた方法

6×His tag 融合プロカテプシン L 500 μ l に 1 N の酢酸を加え pH を 5.0 に調整した。反応液を 30℃で 0、1、2、3、4、5、6 時間反応させ、酵素活性及び SDS-PAGE に供した。

② 緩衝液に硫酸デキストランを加えた方法

6×His tag 融合プロカテプシン L 500 μ l に 0.1 N 酢酸ナトリウム緩衝液 400 μ l、100 μ g/ml 硫酸デキストリンを 100 μ l 加え、1 N 酢酸で pH を 5.3 に調整した。反応液を 30℃で 0、1、3、6、9、12、18、24 時間反応させ、酵素活性及び SDS-PAGE に供した。なお SDS-PAGE に供した反応液には、反応後システインプロテアーゼインヒビターである E-64 (終濃度 1 μ M)を加え自己触媒反応の停止を行った。

実験結果

1. コイカテプシンL遺伝子の発現用ベクターへの組込み

プライマーCath.L-BとCath.L-Hを用いPCR法を行ったところ約1 kbpに特異的バンドが検出されたため、この増幅断片を本章実験方法(6)①にしたがって発現用ベクターに組込み、DNAシーケンサーにて塩基配列の確認を行ったところ、両端に制限酵素サイト *Bam*H I, *Hind* III が付加されたコイカテプシンL遺伝子であることが確認された。そのため以後、このクローンを発現実験に用いた。

2. 6×His tag 融合プロカテプシンLの誘導発現

IPTGで4時間誘導後の集菌した菌体をSDS-PAGEに供した(Fig. 32, レーン2)。その結果約41 kDaに発現タンパク質を検出した。そこで発現タンパク質を可溶化するために菌体を超音波破碎後、遠心分離した後、上清と沈殿をSDS-PAGEに供した(Fig. 32, レーン3、4)。その結果、発現タンパク質は沈殿に検出され、封入体を形成していた。従って、変性条件下で菌体の可溶化を行い、アフィニティー精製に用いた。

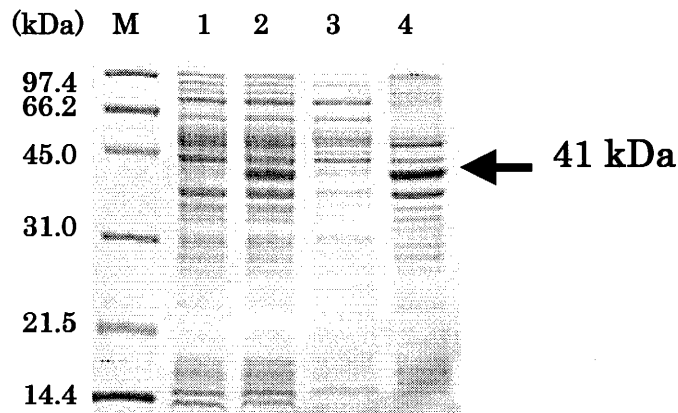


Fig. 32. SDS-PAGE of 6×His tagged procathepsin L. Lane M, molecular weight marker; Lane 1, noninduced cells; Lane 2, cell lysate; Lane 3, supernatant; Lane 4; pellet.

3. 6×His tag 融合プロカテプシンLの精製

TALON™spin column に供した際の未吸着の試料とイミダゾールで溶出後の試料を SDS-PAGE に供した(Fig. 33A、レーン 3、4)。その結果、溶出後の試料に約 41 kDa の発現タンパク質が確認された。次いでコイカテプシン L 特異抗体¹⁵⁾を用いて精製された発現タンパク質との免疫交差性を調べた。その結果、精製されたタンパク質と同じ位置に免疫交差性を示すバンドが検出されたため、この発現タンパク質は 6×His tag 融合プロカテプシンLと断定した(Fig. 33B,C)。

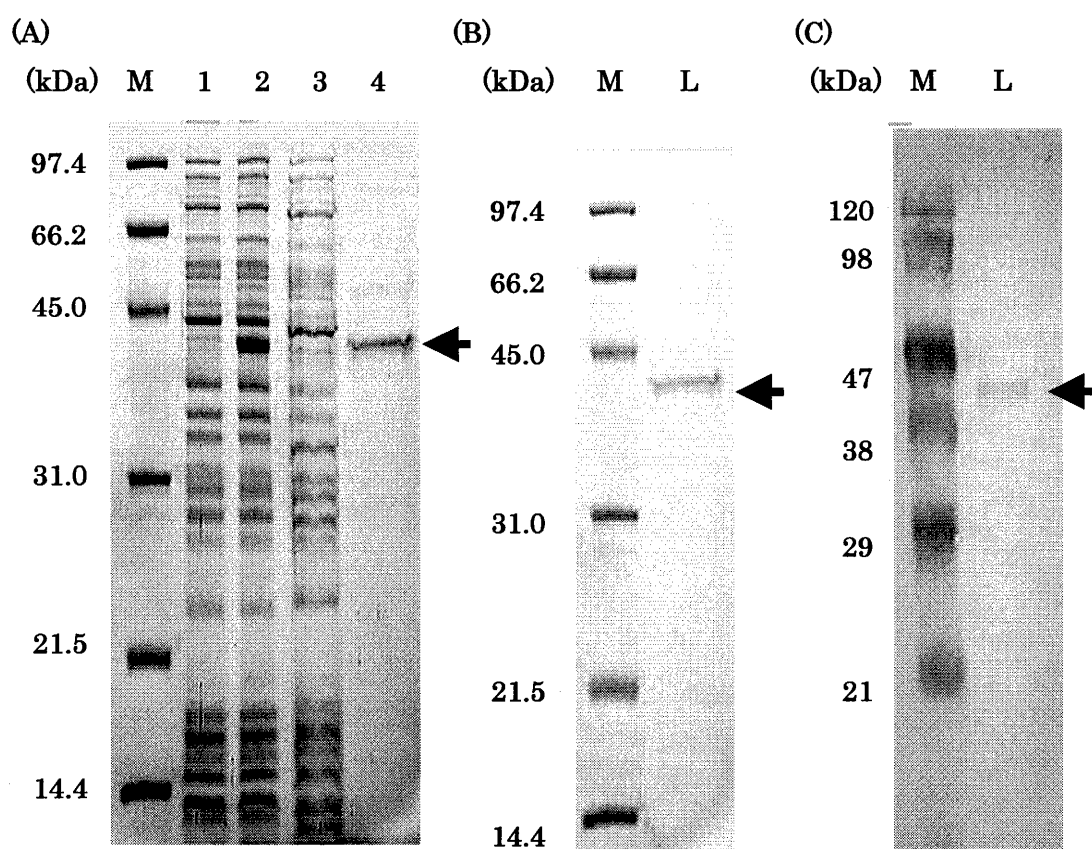


Fig. 33. SDS-PAGE and immunoblot analysis of purification of 6×His tagged procathepsin L. (A). SDS-PAGE of purification steps. Lane M, molecular weight marker; Lane 1, noninduced cells; Lane 2, cell lysate; Lane 3, flow through; Lane 4, eluates. (B). SDS-PAGE of purified 6×His tagged procathepsin L. Lane M, molecular weight marker; Lane L, 6×His tagged procathepsin L. (C). Immunoblot analysis of purified 6×His tagged procathepsin L. Lane M, molecular weight marker; Lane L, 6×His tagged procathepsin L. All arrows indicate expressed fusion protein (41 kDa).

4. N末端アミノ酸配列の決定

透析後の発現タンパク質をプロテインシークエンサーに供したところ、N末端より34残基決定した(Fig. 34)。N末端より5残基目より6個のヒスチジンをもち、第一章で推定したコイカテプシンLの開始メチオニンより22残基を含む融合タンパク質であることが確認されたため、6×His tag 融合プロカテプシンLの発現が確認された。

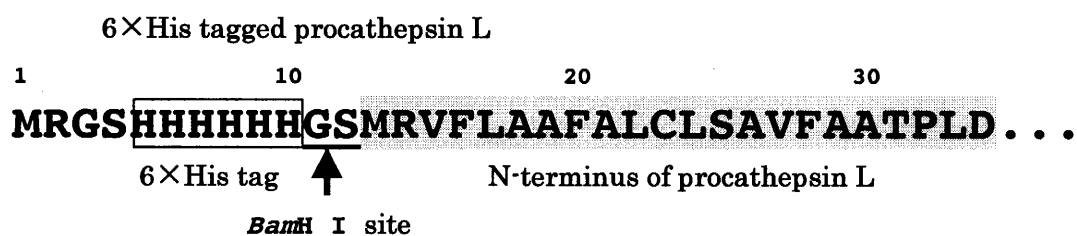


Fig. 34. N-terminal amino acid sequence of 6×His tagged procathepsin L. Boxes indicate 6×His tag sequence. Underline indicate *Bam*H I site. Gray boxes indicate N-terminus of procathepsin L.

5. 6×His tag 融合プロカテプシン L の自己触媒的活性化の検討

初めに実験方法 (7) ①の条件で自己触媒的活性化を検討した。その結果、酵素活性は活性化処理後 1 時間より徐々に上昇し、6 時間後には 0 時間に比べて約 5 倍の活性が見られた。また、活性化処理後 6 時間の反応液を SDS-PAGE に供したところ、約 31 kDa にかすかにタンパクバンドを検出したが、41 kDa の 6×His tag 融合プロカテプシン L のタンパク質も 0 時間と同様にかかなり濃く検出したことより、本法での活性化処理では不十分であると推測される。

次に実験方法 (7) ②の条件で自己触媒的活性化を検討した。その結果、酵素活性は 0 時間に比べて 1~24 時間で 2~3 倍に上昇した。また、0~24 時間までの反応液を SDS-PAGE に供したところ、41 kDa の不活性前駆体酵素である 6×His tag 融合プロカテプシン L は、0 時間より、1 時間、3 時間と次第に消失した。一方 32 kDa の活性を持つタンパク質は 1 時間より徐々に増え、6 時間でもっとも濃くなった(Fig. 35)。またこの 32 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーに供したところ、コイカテプシン L の成熟型酵素より 7 残基上流からのシーケンス(MRPNFLEVPNSLD)であった。このことよりカテプシン L のみでは完全な活性化が行われないことが示唆された。

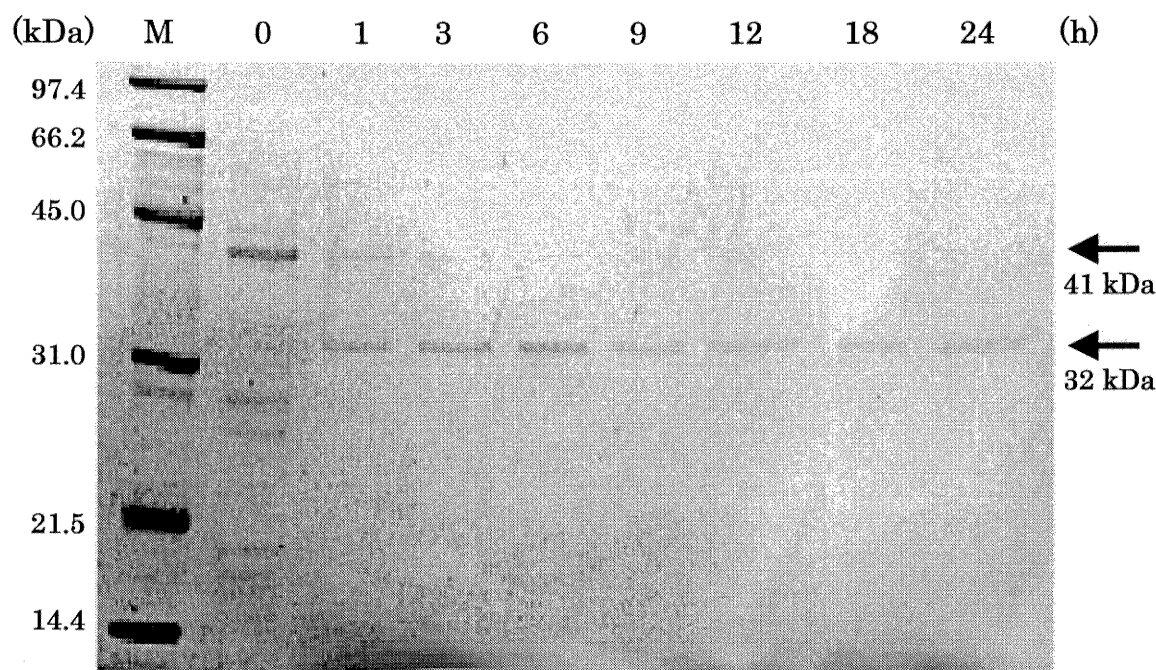


Fig. 35. SDS-PAGE of autocatalytic processing of 6 × His tagged procathepsin L. M, molecular weight marker.

そこで、市販の各種エキソペプチダーゼ（ロイシンアミノペプチダーゼ及びカテプシン C（いずれも SIGMA 社製））を用いて、*in vitro*での完全な成熟型酵素の獲得を試みた。

まず、両酵素を同時に用いて試みた。6×His tag 融合プロカテプシン L 500 μ l に 0.1 N 酢酸ナトリウム緩衝液 400 μ l、1 N 酢酸で pH を 5.3 に調整した。さらに 100 μ g/ml 硫酸デキストラン 100 μ l、ロイシンアミノペプチダーゼ 0.5 μ g、カテプシン C 0.9 μ g、0.4 mM システイン 25 μ l を加え、反応液を 30℃で 0、1、3、6 時間反応させ、酵素活性及び N 末端アミノ酸配列分析に供した。その結果、活性は反応後徐々に上昇し、5 時間で最大の活性を示し、6 時間でも活性は持続していた。また、0 時間と比べて 5 時間では約 6 倍の活性を示した。そのため、5 時間後の約 32 kDa のバンドをシークエンサーに供し N 末端アミノ酸配列を調べたところ、成熟型酵素の N 末端アミノ酸配列より 1 残基上流でプロセッシングされていることがわかった。また、サブピークでは 6 残基上流でプロセッシングされていることがわかった(Fig. 36A)。

そこで、次にそれぞれ単独でのプロセッシング反応を試みた。反応系は上記方法と同じである。その結果、カテプシン C のみでは、反応後 1 時間で最大の活性を示し、その後徐々に活性は減少し、3 時間で 0 時間と同じになった。そこで反応後 3 時間のバンドをプロテインシークエンサーに供したところ、両酵素を加えた時と同じシークエンスが得られた(Fig. 36B)。一方ロイシンアミノペプチダーゼのみでは、反応後 1 時間で一度活性が減少し、その後、活性は徐々に上昇し反応後 4 時間で最大の活性を示し、その後減少していった。反応後 5 時間のタンパクバンドの N 末端アミノ酸配列を調べたところ、N 末端より 1 残基上流でプロセッシングを受けていることがわかった(Fig. 36C)。

これまでの方法では、完全な N 末端アミノ酸配列が得られなかったため、カテプシン C を加えて 3.5 時間後にロイシンアミノペプチダーゼを加えた。すると、反応後 4.5 時間で最大の活性を示し、その後緩やかに減少していった。そこで反応後 5.5 時間のタンパクバンドをプロテインシークエンサーに供したところ、成熟型酵素の N 末端より 1 残基上流であったが、サブピークには成熟型酵素の N 末端アミノ酸配列が現れた(Fig. 36D)。

(A)	
	(-6) (1)
N-terminal amino acid (main)	EVPNSLD
N-terminal amino acid (sub)	EPNFLEV.....
(B)	
	(-6) (1)
N-terminal amino acid (main)	EVPNSLD
(sub)	EPNFLEV.....
(C)	
	(1)
N-terminal amino acid (main)	EVPNSLD
(D)	
	(1)
N-terminal amino acid (main)	EVPNSLD
(sub)	VPNSLD

Fig. 36. N-terminal amino acid sequences of activated recombinant cathepsin L. (A), add leucine aminopeptidase and cathepsin C. (B), add cathepsin C. (C), add leucine aminopeptidase. (D), add leucine aminopeptidase after added cathepsin C. Gray boxes indicate mature enzyme.

6. 精製酵素との酵素学的諸性質の比較検討

活性化した発現酵素と Aranishi らがコイ肝臓より精製したカテプシン L¹¹⁾ の酵素学的諸性質を比較検討した。

(1) 基質特異性の比較

活性化した発現酵素の各種合成基質に対する特異性を調べ、精製酵素との比較検討を行った (Table 2)。なお、カテプシン L の特異基質である Z-Phe-Arg-MCA の相対活性を 100 % とした。比較した結果、両酵素とも Z-Phe-Arg-MCA, Boc-Val-Leu-Lys-MCA 以外に水解活性は示さず、基質特異性は酷似していた。

Table 2. Substrate specificities of recombinant enzyme and carp cathepsin L. Boc-, t-Butyloxycarbonyl-, Suc-, Succinyl-.

Substrate	Relative activity (%)	
	<u>Recombinant enzyme</u>	<u>Native enzyme</u>
Z-Phe-Arg-MCA	100	100
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	5	16
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA	0	0
Boc-Leu-Lys-Arg-MCA	0	0
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	0	0
Boc-Arg-Gly-Pro-Arg-MCA	0	0
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	0	0
Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA	0	0
Suc-Gly-Pro-MCA	0	0
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0	0
Z-Arg-Arg-MCA	0	1>
Arg-MCA	0	-

(2) 酵素活性に及ぼす阻害剤の影響の比較検討

活性化した発現酵素の各種プロテアーゼ阻害剤に対する影響を調べ、精製酵素と比較検討した(Table 3)。基質には Z-Phe-Arg-MCA を用い阻害剤無添加時の活性(コントロール)を相対活性 100 %とした。なお、添加した各種阻害剤の濃度は Table 2 に示した通りである。発現酵素は E-64、ロイペプチン、TLCK で強く阻害された。精製酵素と比較して発現酵素の方がよく阻害されていたが、両者とも阻害の特徴は比較的類似していた。

Table 3. Effect of various chemicals of recombinant enzyme and native cathepsin L.

Chemical	Final conc. (mM)	Relative activity (%)	
		<u>Recombinant enzyme</u>	<u>Native Cath.L</u>
Control	-	100	100
E-64	3.0×10^{-4}	6	43
Leupeptin	1.0×10^{-4}	0.6	6
TLCK	1.0×10^{-3}	2	35
STI	1.0×10^{-2}	89	105
EDTA	5.0	98	116

(3) 酵素活性の及ぼす pH の影響の比較検討

Z-Phe-Arg-MCA 水解活性に対する発現酵素の至適 pH を調べ、精製酵素との比較検討を行った(Fig. 37)。発現酵素の至適 pH は精製酵素よりは若干低く pH 6.0 付近であった。

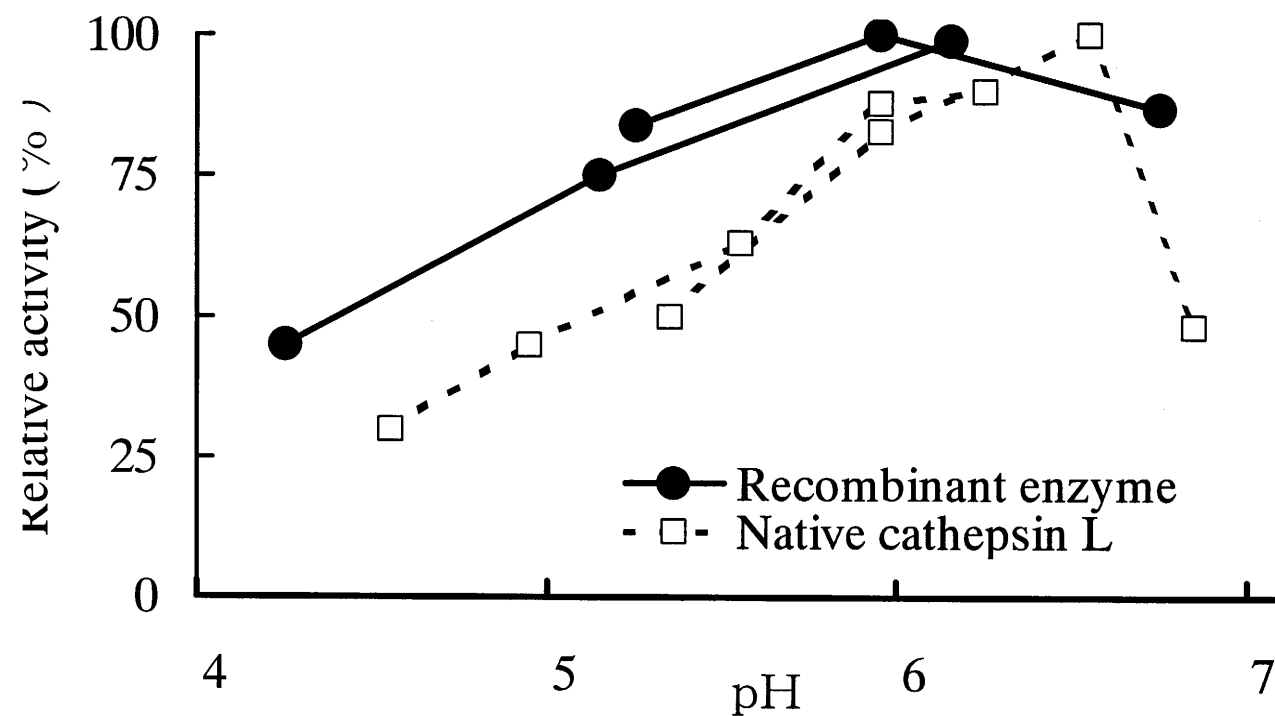
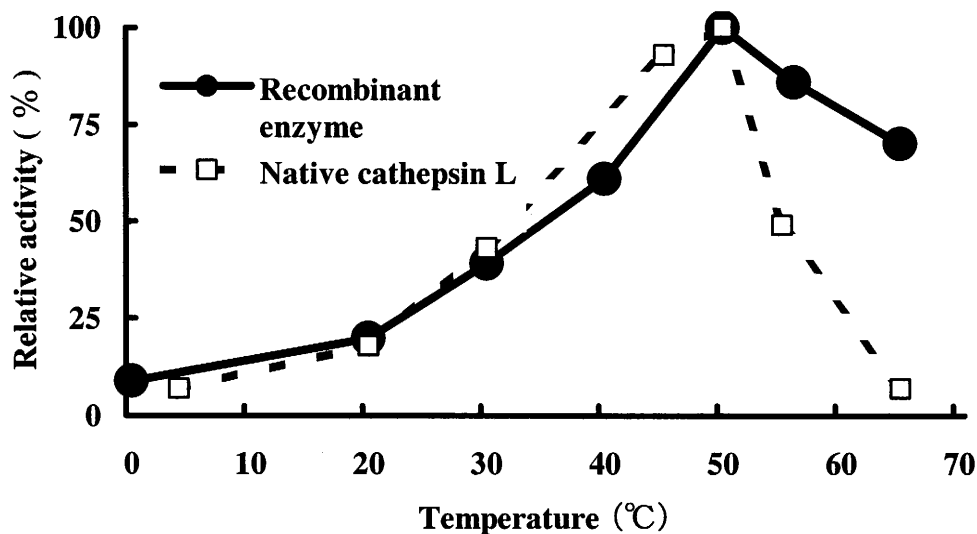


Fig. 37. Effects of pH on the activity of recombinant enzyme and native cathepsin L. pH 4-6, Acetate buffer; pH 5-7, Tris-HCl buffer.

(4) 酵素活性に及ぼす温度の影響の比較検討

Z-Phe-Arg-MCA 水解活性に対する発現酵素の至適温度、温度安定性を調べ比較した (Fig.38A, B)。その結果、至適温度は 50℃であり精製酵素と一致した。しかし、発現酵素は、65℃でも高い酵素活性を保持していた。また、温度安定性はほぼ同じ性状を示した。

(A)



(B)

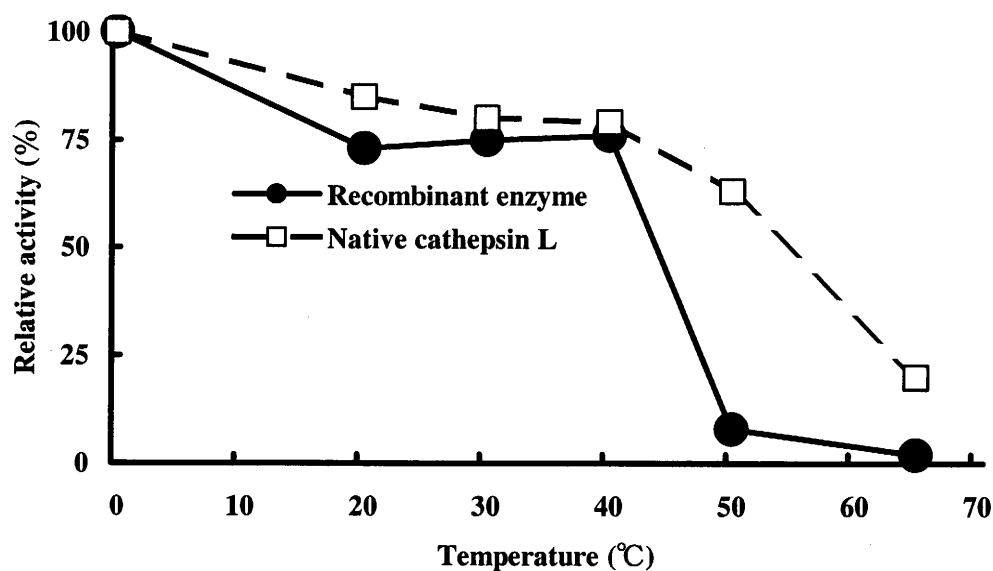


Fig. 38. Effects of temperature on the activity and stability on the recombinant enzyme and native cathepsin L. (A), activity. (B), stability.

考察及び小括

考察

カテプシン L の活性化機構に関する研究は、哺乳類を中心に進められており²¹⁾、特に免疫系における抗原ペプチドのプロセッシングや、抗原提示細胞の抗原提示因子(MHC class-II 分子)の活性化に深く関与していることにより、^{9, 10)} 最近研究が盛んに行われている。哺乳類においてカテプシン L はリボソーム上で合成された後、シグナルペプチド(プレ部)によって小胞体へ誘導され、そこで糖鎖(マンノース)が付加される。シグナルペプチダーゼによりシグナル部がプロセッシングされプロカテプシン L となりゴルジ体へ輸送され、その後マンノースが 6 リン酸化され、エンドソーム(リソゾームの前駆体)の膜上にあるマンノース 6 リン酸レセプターに結合し、エンドソーム内へと運ばれる。エンドソームが活性化されリソゾームになる過程で主にシステインプロテアーゼによってプロ型から一本鎖の成熟型カテプシン L へと活性化される。²¹⁾ しかし魚類においては報告例がほとんどなく、その生合成や活性化機構も明らかとされていない。そこで本研究では魚類カテプシン L の生合成や活性化機構を明らかとするために必要不可欠となるカテプシン L の不活性前駆体酵素を得るために遺伝子組換え技術による確立を行った。

当初、魚類カテプシン群の遺伝子組換え技術による大量発現系の構築に関する報告がなく、一般的によく用いられる 6×His tag 融合タンパク質発現系とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質発現系の 2 通りで行った。GST 融合タンパク質発現系での実験では、本報告での 6×His tag 融合タンパク質発現系と同じく封入体を形成していた。従って、変性条件下で可溶化を行いアフィニティー精製を行った。しかし発現タンパク質の精製は出来なかった。おそらく、変性剤により GST が変性し、Glutathione Sepharose 4B カラムに結合しなかったと推測される。そこで本研究では GST 融合タンパク質発現系を断念し、6×His tag 融合タンパク質発現系での大量発現系の構築を試みた。

当初、6×His tag 融合プロカテプシン L を発現させる際に、形質転換菌を 40 ml の培地に移し培養した際と同じ条件下(37℃、135 rpm)で IPTG を添加し発現誘導を行ったが、かなり効率が悪かった。そこで条件を変えて(30℃、80 rpm)発現誘導を行った。発現効率が悪かった原因は、宿主大腸菌が細胞分裂する際の分裂速度が速すぎて、プラスミド伝達に支障をきたしていたと思われる。従って、温度、回転数ともに下げることによってこの問題を解決した。

発現した 6×His tag 融合プロカテプシン L を可溶化するために超音波破碎を行ったが封入体を形成し可溶化は不可能であった。また、Triton X 100, Tween® 20 などの非イオン性界面活性剤を添加し超音波破碎を行ったがやはり封入体を形成し可溶化できなかった。恐らくは 6×His tag 融合プロカテプシン L にある多数の疎水性アミノ酸で構成されているシグナルペプチド部と、宿主大腸菌由来の疎水性タンパク質や細胞膜などと結合していると

考えられる。そこで変性剤であるグアニジン塩酸塩をカラムの溶出緩衝液に加えたが、完全には可溶化できなかった。まだまだ再考の余地があると思われる。その後、変性条件下で精製した 6×His tag 融合プロカテプシン L を再生するために、透析を行ったが、Turk らの方法²⁸⁾を参考にグアニジン塩酸塩より変性力が弱い尿素を含む緩衝液で緩衝液を交換した。これは直接透析を行わず、より変性力の弱い尿素で変性条件を軽くするためと、グアニジン塩酸塩が SDS-PAGE の泳動像に影響を及ぼしたためである。また Kominami らの報告²⁹⁾を参考に透析を行い、6×His tag 融合プロカテプシン L の再生を行った。再生後の 6×His tag 融合プロカテプシン L を活性化処理せずに活性測定を行ったところ酵素活性を示した。同時に SDS-PAGE にも供したが、41 kDa の 6×His tag 融合プロカテプシン L のタンパクバンドしか検出されなかった。恐らくはプロ型でもわずかに活性を持っているのか、透析時に活性化されたカテプシン L が微量ながら含まれているものと推測される。いずれにしても本方法でタンパク質の再生が可能であった。この再生したタンパク質を抗コイカテプシン L 抗ラット IgG 及び結果には示していないが抗コイカテプシン L 抗ウサギ抗体を用いてイムノブロッティングに供した結果、共に 41 kDa の 6×His tag 融合プロカテプシン L と同じ位置に免疫交差性を示し、N 末端アミノ酸配列を調べた結果、6×His tag 融合プロカテプシン L の推定アミノ酸配列と完全に一致したことにより、本発現タンパク質が 6×His tag 融合プロカテプシン L であることが証明された。

活性化したカテプシン L を得るために低 pH での自己触媒的活性化処理を行った。pH を 5.0 に下げたのみでは、6 時間後に 0 時間の約 5 倍に酵素活性が上昇し(Fig. 35A)、24 時間で 30 倍に上昇したが、SDS-PAGE では 6 時間後に 41 kDa の 6×His tag 融合プロカテプシン L がまだかなり残っており、32 kDa の成熟型酵素はあまり検出できなかった(Fig. 35B)。また 24 時間後には不活性前駆体酵素も成熟型酵素もほとんど検出されず、低分子に分解産物とおもわれるタンパク質がかなり検出された。そのため本方法では成熟型酵素を得るのには不十分であると考えた。そこで Kominami らの方法²⁹⁾を参考に硫酸デキストランを加えて自己触媒的活性化処理を行った。カテプシン L はリソゾーム内膜の糖鎖付近で安定な状態でプロセッシングを受けているといわれている。そのため硫酸デキストラン(デキストラン(α -1, 6-グルカン)の硫酸エステル)のような酸性多糖を加えることで自己触媒的活性化を促進するというものである。その結果、酵素活性は数倍にしか上昇しなかったが、41 kDa の不活性前駆体は時間と共に消失し、32 kDa の成熟型は時間と共に現れ反応後 6 時間で最大となった(Fig. 36)。しかし活性の上昇が前述の方法より低かったため、この 32 kDa のタンパクバンドの N 末端アミノ酸配列を調べた。その結果、成熟型酵素の N 末端より 7 残基上流でプロセッシングされていることがわかった。そのため活性の上昇が pH を下げただけの時より低かったものと思われる。またこの結果より、コイリコンビナントカテプシン L の活性化には他のエキソペプチダーゼがいるものと思われる。そこで、エキソペプチダーゼである、ロイシンアミノペプチダーゼとカテプシン C を用いた。各種組み合わせを検討した結果、カテプシン C で反応させたのち、ロイシンアミノペプチダーゼを加えると、

マイナーではあるが完全な成熟型酵素を得る事が出来た(Fig. 36D)。しかし、マイナーピークであり *in vitro* での反応である事により今後、更に検討していく必要がある。また、Fig.36で two-chain form を取ると現れるであろう 24-25 kDa の重鎖と 5 kDa の軽鎖は現れなかった。Hara、⁸⁾ Kominami⁹⁾ らの報告によれば哺乳類においてパルスチェイス法により、成熟型カテプシン L は自身によって速やかにプロセッシングを受け two-chain form を取ることが知られている。このことから、発現酵素からもコイカテプシン L は two-chain form を取らないことが示唆された。

不完全ではあるが本 32 kDa の発現酵素の酵素学的諸性質を調べた結果、精製酵素と非常に酷似していた(Table 1, 2, Fig. 37, 38)。従って、本発現酵素はコイカテプシン L であり、第一章で決定した遺伝子はコイカテプシン L 遺伝子であると確証するに至った。

今後は、より様々な条件での自己触媒的活性化の検討並びに、6×His tag 融合プロカテプシン L を用いて特異抗体を作成しパルスチェイス法での活性化機構の解明が課題である。

小括

1. 組換え体を用いたコイカテプシン L の大量発現系の構築に成功した。
2. 不完全ではあるが活性を持つ成熟型カテプシン L を得ることに成功した。
3. 発現酵素を用いた自己触媒的活性化では two-chain form を取らないことが確認された。
4. 酵素学的諸性質は精製酵素と発現酵素とではほとんど同じであった。

第四章 コイカテプシン L mRNA の組織分布及び

遺伝子構造に関する研究

本章ではコイカテプシン L mRNA の組織分布及び遺伝子構造解析を研究した。

mRNA の発現レベルを組織別に調べることで、生体内での生理的役割が理解できる。哺乳類カテプシン L は様々な臓器で発現しているといわれている。¹⁾ しかしながら魚類カテプシン L mRNA の発現レベルに関する研究は、発生学的な研究にとどまっている。^{17, 18)} 魚類カテプシン L の生理的な役割を理解するには mRNA がどのような組織でどれくらい発現しているのか、調べておく必要がある。また、哺乳類(ヒト、ラット、マウス)カテプシン L は8個のエクソンからなり、エクソン2からエクソン8に ORF があることがわかっている。しかし魚類カテプシン L の遺伝子構造に関するデータはなく、全てのタンパク質の設計図である遺伝子構造が明らかになれば、コイカテプシン L がどのように発現調節がなされているのか知ることが出来る。さらにタンパク質の一次構造レベルでの違いに関する新たな知見も得られるかも知れない。

本章ではノーザンブロットィングや PCR 法等の手法を用いることによりコイカテプシン L mRNA の発現分布及び遺伝子構造を明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. 試料魚

幸田水産(株)より購入した養殖コイ(魚体重約 0.8~1.0 kg)より各組織を摘出し、ただち mRNA の組織分布解析用の RNA 抽出に使用した。また、同時にゲノム DNA 用に肝臓約 1 g をゲノム DNA 抽出用に用いた。

2. 実験用試薬及び機器

実験用試薬及び機器は第一章と同様のものを用いた。Tween®-20(ICN biomedical 社製)以外の試薬には特記しない限り和光純薬工業社製の特級試薬を用いた。全 RNA の抽出には全 RNA 単離試薬 ISOGEN (NIPPON GENE 社製)を用い、mRNA の精製には mRNA 精製キット GenElute mRNA miniprep Kit(SIGMA 社製)を用いた。ノーザンブロットングの転写にはバキューム式ブロットング装置 VacuScan XL Vacuum Blotting System(Amersham biosciences 社製)を用いた。ノーザンハイブリダイゼーションのプロローブの標識には PCR DIG(ジゴキシゲニン-11-dUTP)プロローブ合成キットを、その検出用二次抗体にはアルカリホスファターゼ(AP)標識抗ジゴキシゲニン(DIG)抗体(Roche Diagnostics GmbH 社製)を用いた。また DIG 検出用の化学発光基質には CSPD®(Roche Diagnostics GmbH 社製)を用い、その検出にはゲル撮影装置 ATTO CoolSaver AE-6955(ATTO 社製)を用いた。

3. 実験方法

(1) ノーザンハイブリダイゼーション

① 全 RNA の抽出

全 RNA の抽出は第一章実験方法 (1) と同様の方法で各種組織(肝臓、脾臓、腎臓、腸、心臓、筋肉、えら、目、脳、精巣、卵巣)より全 RNA を抽出し、直ちに mRNA の精製に使用した。

② mRNA の精製

mRNA 精製キット GenElute mRNA miniprep Kit のプロトコルに従い精製を行ない、使用時まで-80℃に保存した。なお、本キットはオリゴ dT カラムであり、mRNA のポリ(A)がオリゴ dT との高い親和性を持つことを利用して mRNA を精製するものである。

③ ノーザンブロットング

mRNA 各 5 µl をホルマリン変性 1 %アガロースゲル電気泳動に供し、アルカリ変性、中和処理後、ナイロンメンブレン(Hybond-N⁺, Amersham biosciences 社製)に吸引法で転写し、80℃で 2 時間処理することにより、メンブレンに RNA を固定した。

④ ハイブリダイゼーション

コイカテプシン L 特異的プライマー CATHL-NT(既出)、CATHL-AP6(5'-GACTCCTCTGAG TCCAGTCCG-3')及び CATHL-SP5(5'-CAGCCCTGCCATTATGATCCC-3')、CATHL-AP5(5'-CACA

TTTGTACATTTAGACAC-3')を用いて二種類のプローブを PCR DIG プローブ合成キットのマニュアルに従って作成した。次いで、固定したメンブレンをハイブリダイゼーション液(20×SSPE(3 M NaCl, 175 mM リン酸二水素ナトリウム、25 mM EDTA、pH 7.4) 2.5 ml、ホルムアミド 5 ml、100×デンハルト液(2%ウシ血清アルブミン、2% Ficoll 400 (Amersham biosciences 社製)、2%ポリビニルピロリドン(PVP)) 0.5 ml、10% SDS 0.5 ml、ddH₂O 1.5 ml)に浸し、42℃で二時間インキュベート後、PCR 法にて作成した DIG 標識プローブを加え、更に 42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、65℃で 1×SSPE-0.1% SDS と 0.1×SSPE-0.1% SDS でそれぞれ 15 分×3 回洗浄を行った。

⑤ DIG 検出

AP 標識抗 DIG 抗体をメンブレン上の DIG と結合させ、洗浄を行ってから 100 倍希釈の CSPD(AP 発光基質)をメンブレン上に滴下し CSPD®の触媒発光反応を誘起させた。メンブレン上の発光シグナルは、ATTO CoolSaver AE-6955(ATTO 社製)にて検出した。また、発光シグナルの数値化には、CS Analyzer (ATTO 社製)を用いた。

(2) コイカテプシン L 遺伝子のゲノム DNA からのクローニング

① ゲノム DNA の調製

コイ肝臓 1 g を、10 倍量の TNE 緩衝液(50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 5 mM NaCl, pH 8.0)を加えホモジナイズし、遠心分離後の上清に 50 mg/ml プロテイナーゼ K(終濃度 0.1 mg/ml)と SDS(終濃度 1%)を加え、55℃で一時間インキュベート後に 37℃で一晩反応させた。その後、フェノール抽出法により除タンパク後、1 mg/ml RNase A(Roche Diagnostics GmbH 社製)を適量加え、37℃で一時間インキュベートし全 RNA の分解を行った。その後、再びフェノール抽出法にて除タンパク後、エタノール沈殿にて DNA のみを回収した。回収した DNA は風乾後、TE 緩衝液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解し使用した。

② PCR 法

調製したコイゲノム DNA を鋳型に PCR 法にてコイカテプシン L 遺伝子の増幅を試みた。反応条件等は第一章 RT-PCR と同じ条件で行った。なお、使用したプライマーはヒトカテプシン L の遺伝子構造を参考(Human Genome Resources; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>)にコイカテプシン L 特異的プライマーを作成した(Fig. 39)。すなわち、エクソン 2/4; CATHL-NT(既出)、CATHL-AP1(5'-TCACGGGAGTCACGTATCCC-3')、エクソン 4/5; CLEX4-SP1(5'-AGGGATACGTGACTCCCGTG-3')、CLEX5-AP1(5'-CCACCAGGTTCTGCTCACTC-3')、エクソン 5/8; CL-2SP(既出)、CL-6(既出)の 3 パターンで ORF の全領域をカバーした。

なお、クローニング法、塩基配列の決定及びその解析は第一章と同様の方法で行った。

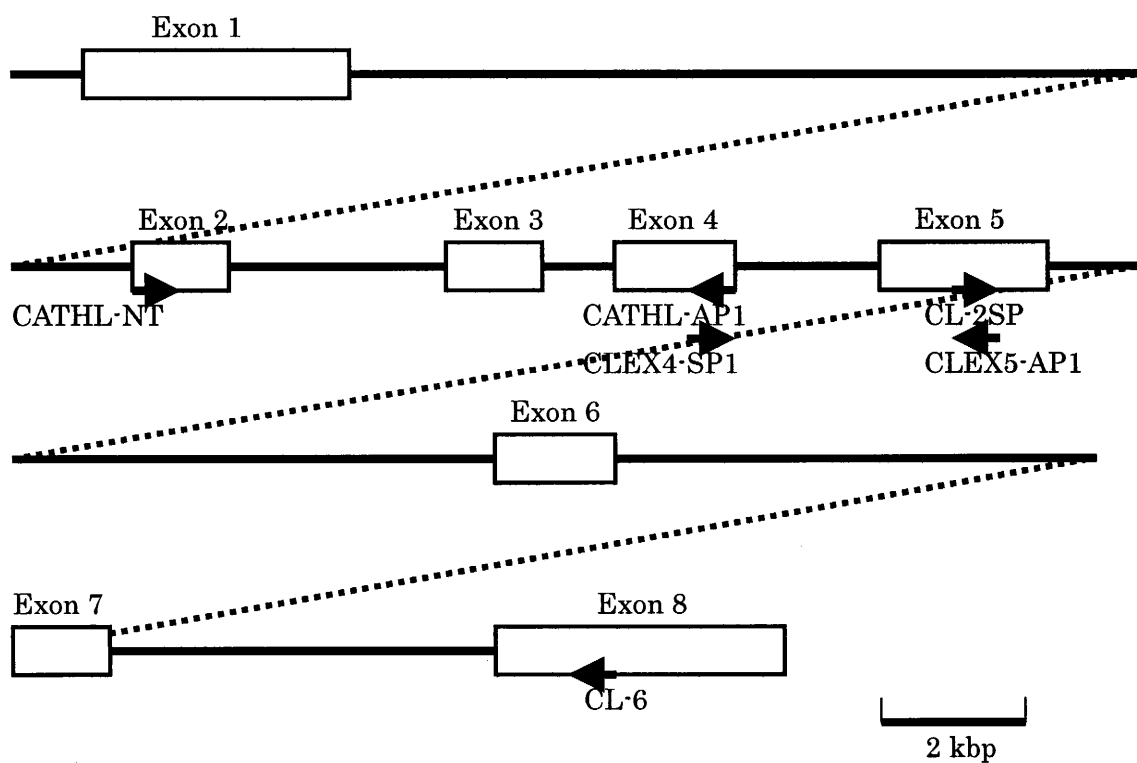


Fig. 39. Gene organization of human cathepsin L and strategy of molecular cloning of carp cathepsin L for genonic DNA.

実験結果

1. コイカテプシン L mRNA の組織分布

コイカテプシン L mRNA の組織分布をノーザンハイブリダイゼーション法を用いて明らかにした。なおコントロールとして、どの細胞にも発現しているハウスキーピング遺伝子の一つである β -アクチンを用い、PCR 法にて β -アクチン特異的プローブを作成し、カテプシン L と同様の方法で β -アクチンのノーザンハイブリダイゼーション法を行った(Fig. 40A)。また、 β -アクチンに対するカテプシン L mRNA の相対発現量を Fig. 40B に示した。

コイカテプシン L mRNA の様々な組織での発現が認められた。その中でも、肝臓、腸、生殖器に特に高い mRNA の発現が確認された。精製酵素に対する特異抗体を用いた ELISA 法によるコイカテプシン L の組織分布¹⁵⁾ 及びラットカテプシン L mRNA の組織分布¹⁾ とほぼ同様の結果を示し、mRNA の発現レベルと酵素タンパク量に相関関係が見られた。

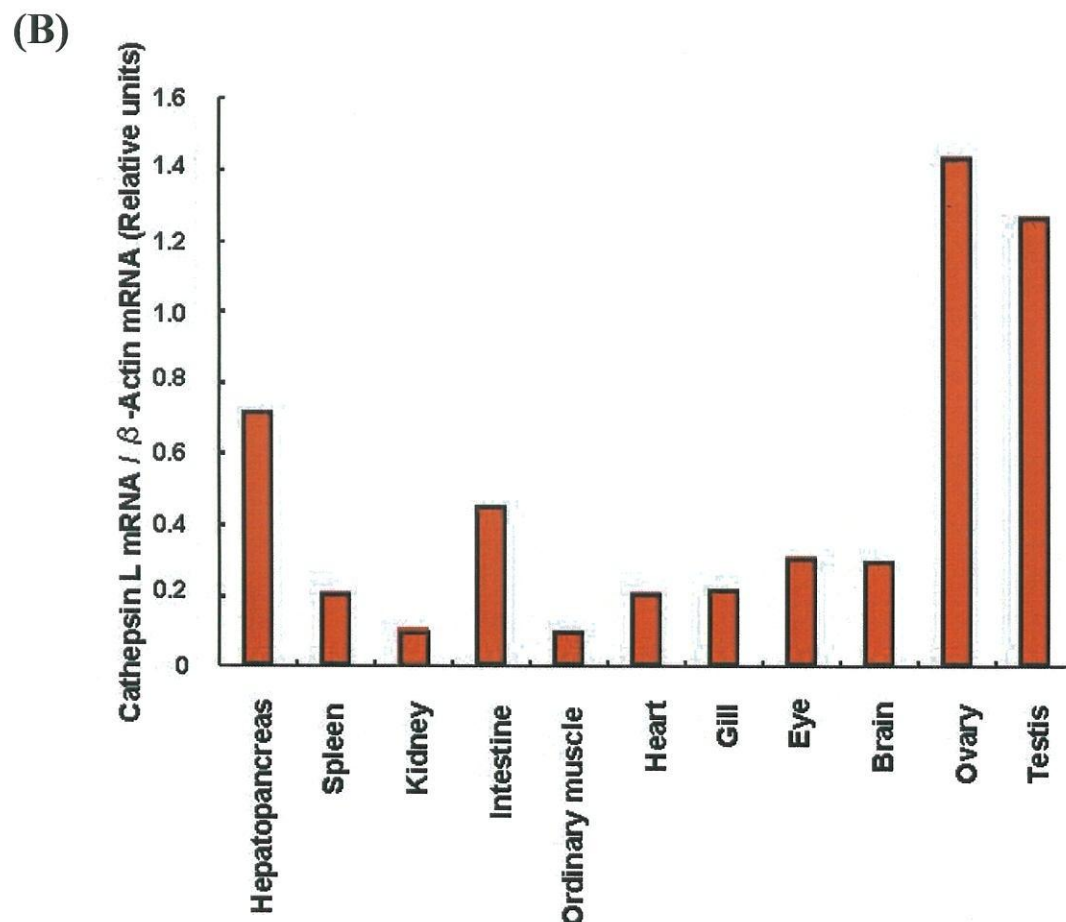
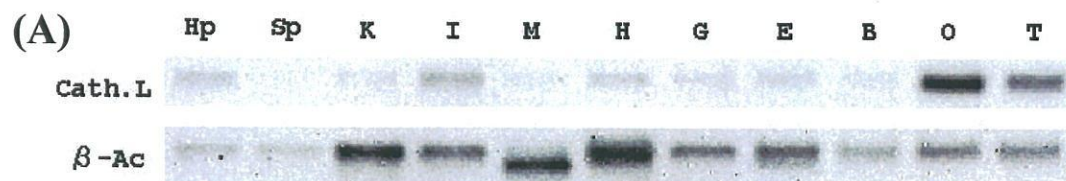


Fig. 40. Tissue distribution of carp cathepsin L mRNAs. (A), northern blot analysis of cathepsin L mRNAs. Cath.L; 5.0 μ l of carp cathepsin L mRNAs from carp tissues. β -Ac; 2.5 μ l of β -actin mRNAs (Gill is only applied 1.5 μ l). Hp; hepatopancreas, Sp; spleen, K; kidney, I; intestine, M, ordinaly muscle, H; heart, G; gill, E; eye, B; brain, O; ovary, T; testis. (B), quantitation of carp cathepsin L mRNA levels in different tissues.

2. コイカテプシン L の遺伝子構造解析

コイカテプシン L 遺伝子をゲノム DNA を用いて PCR 法にて増幅したところ、エクソン 2/4 間では約 500 bp の増幅断片が得られた。ヒトカテプシン L では約 780 bp で約 120 bp 短かった。次にエクソン 4/5 では約 135 bp の増幅断片が得られ、ヒト(約 320 bp)と比べて 185 bp、更にエクソン 5/8 では 435 bp でヒト(約 1,600 bp)と比べて 1165 bp も短かった。これらの増幅断片のクローニングを行い塩基配列を決定したところ、全ての増幅断片でそれぞれオーバーラップし、連結することができた(Fig. 41)。全長は 1,561 bp からなり、ヒト(3,324 bp)と比べて 1,763 bp 短かった。第一章で決定したコイカテプシン L cDNA の塩基配列からエクソン、イントロンの場所を推定すると、ヒトと比較して第 4 イントロン、つまり第 4 エクソンと第 5 エクソンとの間がない以外、イントロンの入る場所は全く同じであった(Fig. 42)。つまり、エクソンサイズはヒトでの第 4 エクソンと第 5 エクソン以外同じであった。また、一般的に遺伝子全般に見られるイントロンの 5'末端の GT と 3'末端の AG 配列が確認されたことより、これがコイカテプシン L 遺伝子の一部であることが明らかになった。

```

1  ATGAGGGTGTGTTTTGGCAGCGTTCGCGTTGTGCCTCAGTGCAGTATTTGCTGCTCCAAC 60
61  TTGGACAAGCAGTTAGACAACCATTGGGAACAGTGGAAGAACTGGCACGGTAAAAAATAC 120
121  CATGAAGTAAGTGTAAAAATCTACATTAACAAGCTGAAAAAGGAGCAAGAAGTGGAACTC 180
181  AGTGTATCTCTTTCAACACAGGAAGGAGGAGGGGTGGAGGCGAATGGTCTGGGAGAAAAA 240
241  CTTGCAAAAGATCGAACTGCACAATCTTGAGCACTCCATGGGCACACACACTTACAGACT 300
301  CGGAATGAACCGCTTTGGTGATATGGTAAGACTGCAGAAGAACTTCATTTGAGGTGCTTG 360
361  CATATTGATTTATGAAATTCCTTCAGCTTTCATCAAACATATTCTATATCTACAGACTCAT 420
421  GAGGAGTTCAGGCAGGTGATGAATGGCTACAAACACAAGAAGGAGAGACGATTCAGAGGA 480
481  TCTCTCTTCATGGAGCCCAACTTCCTGGAGGTCCCAAACAGTTTGGACTGGAGGGAAAAAG 540
541  GGATACGTGACTCCCGTGAAAGATCAGGGTGAGTGTGGTTCTTGCTGGGCCCTTCAGCACT 600
601  ACTGGAGCCATGGAGGGTCAGATGTTTCAGGAAGACCGGAAAACTGGTGTCTCTGAGTGAG 660
661  CAGAACCTGGTGGACTGCTCCCGTCCTGAAGGCAATGAGGGCTGTAACGGAGGTCTAATG 720
721  GACCAGGCTTTCCAGTACATCAAGGACCAGAACGGTCTGGACTCAGAGGAGTCCTACCCC 780
781  TATTTGGGAACGTGAAGTTACATTACCTTTTATTCCTATGATATTATACTGATTAATTAC 840
841  ATGAAGGATTACTGTAACATACATGCTGCTTATCATTTTTTCAGGATGATCAGCCCTGCCA 900
901  TTATGATCCCAAATACAGCGCAGCTAATGACACTGGATTTCGTTGACATTCACAGTGGA 960
961  GGAACATGCTCTGATGAAGGCTATAGCTGCGGTGGGGCCGGTGTCTGTGGCTATTGACGC 1020
1021  CGGACACGAGTCTTTCCAGTCTACACAGTCAGGTATTTTATATTTGTCACCATTAGTTGTT 1080
1081  GAATCCAACCTGCTCTGTGTGTGTGTGTTCACTGTGTGTGTGTGTTTGGATGGGTAAATG 1140
1141  CAGAGCAGAAATCTGAGTATAAGCCACACATGTCCTTTCCTTTTAAGCCAACTAAATGA 1200
1201  CTCTCGACGTTATGAGAAATGAGTGAAGTTGCTCTAATGAATGTATATTCTTGTTAGGC 1260
1261  ATCTACTATGAGAAAGAATGCAGCAGTGAGGAGCTAGATCATGGTGTGCTTGCCGTTGGT 1320
1321  TATGGTTTTGAGGGTGAGGATGTTGATGGAAAGAAGTATTGGATTGTCAAGAACAGGTAA 1380
1381  GAAGATCATTTATGGTCTAAAATTCTGAATGGGCAATGTTTAAAGCAGTGTTTTAACCA 1440
1441  AATGTGTTTTGTGCATTCTACCTGGAGTGAGAATTGGGGTGATAAAGGTTATGTCTACAT 1500
1501  GGCCAAGGACAGACACAACCACTGTGGTATTGCTACAGCTGCTAGCTACCCCTCTCGTCTA 1560
1561  A 1561

```

Fig. 41. Nucleotide sequence of carp cathepsin L gene. Boxes indicate putative exon of carp cathepsin L. Bold letters indicate exon-intron boundary sequences. Dot lines indicate exon 4 to exon 5 of human cathepsin L.

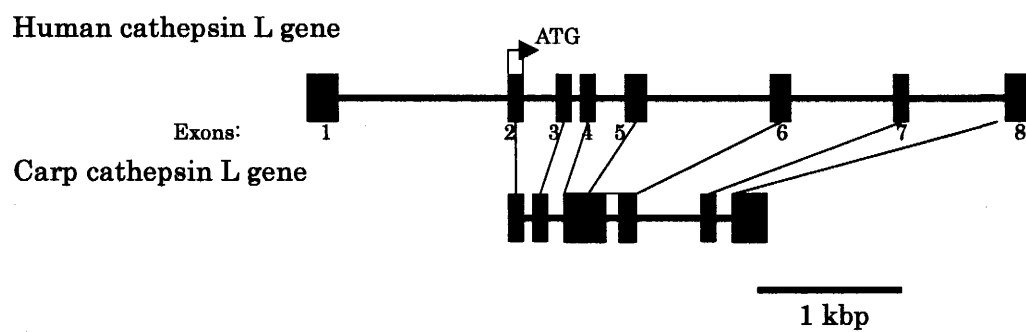


Fig.42. Genomic organization of human and carp cathepsin Ls. Solid bars represent exons.

30) エクソン-イントロン間は一般的に次のような共通配列を持つといわれている(Fig. 43)。

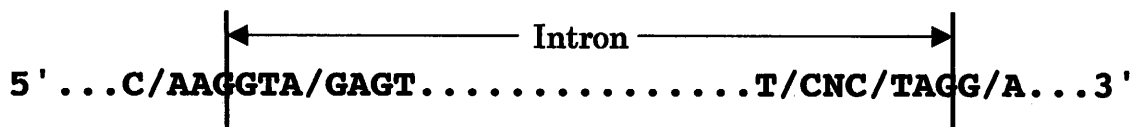


Fig. 43. Common sequences of the 5' splicing donor site and 3' splicing of acceptor site. N is T/C/A/G.

そこでコイカテプシン L 遺伝子のエクソン-イントロン間について解析した(Table 4)。解析の結果、イントロンの 5'領域に多少の共通配列とは異なる配列が見られたものの、よく保存されていることが確認された。

5' donor site		3' acceptor site	
Region	Sequences	Region	Sequences
Exon 2-Intron 2	5'-GAAGTAAGT-3'	Intron 2-Exon 3	5'-CACAGA-3'
Exon 3-Intron 3	5'-ATGGTAAGA-3'	Intron 3-Exon 4	5'-TACAGA-3'
Exon 4-Intron 4	(N/A)	Intron 4-Exon 5	(N/A)
Exon 5-Intron 5	5'-ACTGTAAGT-3'	Intron 5-Exon 6	5'-TTCAGG-3'
Exon 6-Intron 6	5'-CAGGTATTT-3'	Intron 6-Exon 7	5'-GTTAGG-3'
Exon 7-Intron 7	5'-CAGGTAAGA-3'	Intron 7-Exon 8	5'-TCTAGC-3'

Table 4. Exon-intron junction of carp cathepsin L gene. Red letters indicate different sequences of common sequences. Exon and Intron numbers are human number.

考察と小括

考察

本研究では、コイカテプシン L の生理的役割及び遺伝子の発現制御機構を明らかにするのに必要不可欠なコイカテプシン L mRNA の組織分布と遺伝子構造の解析を試みた。

ノーザンハイブリダイゼーション法により mRNA の組織分布を調べるに当って、Söderström らのマウスカテプシン群の組織分布に関する報告³¹⁾を参考に、当初は mRNA 1 μ g で検出を試みた。しかし、肝臓においてコントロールの β -アクチンでは強いシグナルが検出されたがカテプシン L のシグナルは微量で解析には不可能と判断したため、5 μ gで行った。なお、 β -アクチンでは普通筋のみバンドの位置が若干低い、これはプローブが筋原繊維に存在するアクチンが反応しているためである。 β -アクチンのみを検出するプローブの作成が困難であったため、普通筋のみアクチンに対する相対発現量を示した(Fig. 40B)。

コイカテプシン L mRNA は、生殖器>肝臓>腸>その他の各組織の順に発現レベルが高かった。ラットカテプシン L mRNA では腎臓を除き同様の傾向を示している。腎臓に関してはラットでは ELISA 法によるタンパク当りのカテプシン L 量もかなり多いことが知られている。¹⁾ 一方、精製酵素に対する特異抗体を用いた ELISA 法によるコイカテプシン L の組織分布では、肝臓>心臓>脾臓、腎臓、筋肉>腸の順に総タンパクあたりの量が多く、¹⁵⁾ 今回の mRNA の発現レベルでも腸を除き同様の傾向が見られた。腸に関しては、あくまで推測だが、コイは無胃魚である。従って、摂餌後の消化機構が胃を持つ哺乳類やその他の魚類と違うことが容易に推測される。それ故に摂餌後の状態によって発現レベルの増減があるのではないかと考えている。一方、生殖器に関しては、哺乳類の場合、生殖器に特異的でカテプシン L と非常に構造が近いカテプシン群が多数報告されている。³²⁻³⁴⁾ また、胎盤に多く放出されるタンパク(Major excreted protein; MEP)がプロ型のカテプシン L であることがわかっている(機能は未だ不明である)。³⁵⁾ しかしながら、魚類においてはそのような報告はなく、それらの機能をカテプシン L が担っている可能性がある。さらにニジマスではカテプシン L は卵形成の初期に顕著に mRNA の発現レベルが上昇することが知られている。¹⁸⁾ しかし現時点で魚類カテプシン群 mRNA の組織分布を調べた報告はなく、生殖器の発現レベルの高さはコイ特有のものなのか、魚類全般に言えることなのかわからないが、用いたコイの生殖器が未成熟段階であったため、生殖器の成熟に深く関与している可能性がある。この点に関しては今後の課題となるであろう。

全体的にコイカテプシン L mRNA の組織分布はラットカテプシン L と同じような傾向を示したことから、生理的な機能もさほど大きくは変わらないものと推測される。従って魚類でも細胞内タンパク分解や免疫系に深く関与しているものと推察される。この点に関しては *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いたりして明らかにしていく必要がある。ま

た、mRNA の発現量と酵素タンパク量に相関が見られたところから、タンパク合成から速やかに活性化することが予想される。この点については現在パルスチェイス法で研究中である。

コイカテプシン L の遺伝子構造については、当初サザンブロットティング法での検出を試みた。遺伝子の上流域にはプロモーターと呼ばれる遺伝子発現の制御を行なっている領域があり、未知領域のクローニングにはサザンブロットティング法が一番確実だからである。しかしクローニングに最適なサイズのバンド(約数 kbp)が得られず、いまだ各種制限酵素を組み合わせたり条件を検討中である。そこで、今回はまず既知の ORF の部分を得ることを再優先して PCR 法にて行なった。

コイカテプシン L 遺伝子はヒトと比べて半分くらいの大きさであった(Fig. 42)。イントロン 4、5、7 が極端に短く、イントロン 4 は無い可能性が出てきた。イントロン 4 はヒトでは 189 bp と短く、その位置は成熟型酵素の N 末端と活性中心であるシステイン残基との間に相当する。ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*³⁶⁾ や線虫 *Caenorhabditis elegans*(Eukaryote Genome Projects in Progress; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomics/static/EG-T.htm/>)のカテプシン L においても欠損していることが見られる。しかし、コイについては遺伝子の多重化も報告されており、³⁷⁾ 本当にイントロン 4 が欠損しているのか詳細に調べる必要がある。今後はゲノムライブラリーを作成したり、ゲノム DNA を制限酵素で消化してサザンハイブリダイゼーション法で検出など実証していく必要がある。

今秋(09/20/2003)、Watabe らにより、マイワシ *Engraulis japonicus* のカテプシン L 遺伝子(ゲノム DNA)の全塩基配列(GenBank accession no. AB106359)が公開された。そこで、コイカテプシン L 遺伝子とマイワシカテプシン L とを比較してみた。イントロン 4 を除くイントロンの入る場所は全く同じであった。また、イントロンサイズはイントロン 4、5 以外はさほど違いは見られなかった。また、マイワシカテプシン L 遺伝子のエクソン-イントロン間では、コイと同様にイントロンの 5'領域に多少の共通配列とは違う配列があったものの、よく保存されていることがわかった。ヒトカテプシン L⁶⁾ や、カテプシン L と一次構造でかなり近いカテプシン S(Human Genome Resources 参照)、破骨細胞に特異的に発現しているカテプシン K((ヒト、^{38, 39)} マウス⁴⁰⁾)においてもイントロンの入る場所はコイカテプシン L と全く同じであった。このことは、これらのカテプシン群は元のオリジナルが同じで、もしかして脊椎動物が現れる頃に分化したのかもしれない。いずれにしても、エクソン-イントロン間の解析によりこの研究で決定したコイカテプシン L 遺伝子は発現可能であることが示唆される。

小括

1. コイカテプシン L mRNA の組織分布では生殖器>肝臓>腸>その他の組織の順に発現レベルが高く、ラットカテプシン L mRNA の組織分布と同様の傾向を示した。
2. 未成熟の生殖器に特に顕著に発現が見られたことにより、生殖器の成熟への関与が示

唆された。

3. コイカテプシン L 遺伝子の ORF に相当する領域の遺伝子構造が明らかになった。
4. コイカテプシン L 遺伝子にはイントロン 4 が欠損していた。
5. イントロン 4 を除き機知のカテプシン L と全く同じ場所にイントロンが存在していた。
6. エクソン-イントロン間の保存領域はかなり保存されており、発現可能な遺伝子であることがわかった。

第五章 コイカテプシン L 様酵素遺伝子のクローニング

本研究では、コイカテプシン L にアイソフォームが存在するのか調べるために、カテプシン L 様酵素並びにカテプシン L に酵素学的、一次構造的に非常に類似で魚類で唯一精製酵素の報告があるカテプシン S の遺伝子クローニングを行った。

カテプシン S (EC 3.4.22.27) は、中性域に至適 pH を持ち、かつ広い pH 域で活性を有する唯一のエンド型システインプロテアーゼである。⁴¹⁾ 近年カテプシン S はカテプシン L と同様、抗原提示細胞内において抗原ペプチドのプロセッシングや MHC・Class II 分子のインバリエント鎖(Ii)のプロセッシングと T 細胞の発達に深く関与しているという報告がある。

27, 42, 43)

一方、魚類では当研究室で Pangkey らが報告した、コイ肝臓カテプシン S に関する酵素学的諸性質並びに N 末端アミノ酸配列に関する知見があるのみである。^{44, 45)} カテプシン S は中性域に至適 pH を持つという性質から、魚筋肉の自己消化に深く関与しているものと考えられている。⁴⁵⁾ また、精製酵素での分子量が 37 kDa とウシ(24 kDa)と比べて極端に大きい。⁴⁴⁾ 成熟型酵素では糖鎖の存在も確認されていないことよりなぜ分子量が極端に大きいのか興味を持たれる。また、魚類では報告例がほとんど無いことから、カテプシン L のアイソフォームという形で存在している可能性もある。

そこで本研究では、コイカテプシン S 遺伝子のクローニングを行い、同時にカテプシン L のアイソフォームの検出を試みた。

実験方法

1. 実験魚

幸田水産(株)より購入した養殖コイ(魚体重約 0.8~1.0 kg)より各組織を摘出し、ただち全 RNA 抽出に使用した。

2. 遺伝子組換え実験用試薬及び機器

第一章と同じ試薬及び機器を用いた。

3. 実験方法

(1) 全 RNA の抽出及び mRNA の精製

第一章と同じ方法でコイ肝臓より全 RNA の抽出を行った。その後、第四章と同じ方法で mRNA を精製し、後の一本鎖 c DNA の合成に使用した。

(2) RT-PCR

第一章と同じ方法で合成した一本鎖 c DNA を用い、コイカテプシン S の N 末端アミノ酸配列 (VPDAMDWRYNKGYVTDVKDQ)⁴⁴⁾ に基づいて作成したプライマー CAS-1(5'-GTT/C/A/GCCT/C/A/GGAT/CGCT/C/A/GATGGAT/CTGGTAT/C-3')、CAS-3(5'-GCT/C/A/GATGGAT/CTGGTAT/CAAT/CAAA/GGG-3')と CAL-H(既出)を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応は第一章 RT-PCR と同じ反応系で同じ条件にて行った。また、クローニング及び塩基配列の決定については第一章と同じ方法で行った。

実験結果

1. コイカテプシン L 様酵素遺伝子のクローニング

プライマーCAS-1 及び CAL-H を用いて PCR を行ったところ、600 bp 以下にスメアーなバンドしか見られなかったため、プライマーCAS-3 及び CAL-H を用いて semi-nested PCR を行ったところ約 840 bp に特異的バンドが検出されたため、この増幅断片をクローニングし、塩基配列の決定しアミノ酸配列を決定した(Fig. 44)。その結果、 で囲んだアミノ酸配列が Pangkey らが決定したコイカテプシン S の N 末端アミノ酸配列⁴⁴⁾ が確認された。ウシではこの領域では約 540 bp になることより、分子量の問題も解決されると考えたが、配列の途中に終始コドンが見られたことにより、PCR 段階での合成のミスではないかと考え、この解析結果に基に CAS-3 より 3'側にプライマーRT-1(5'-ACTGATGTTAAAGACCAGAAGGAT-3')及び RT-2(5'-GCCTTCAGTGCAGTAAGACCCACA-3')を設計し、再び RT-PCR を試みた。

1	<u>GCCATGGATTGGTACAACAAGGGCTACGTGACTGATGTTAAAGACCAGAAGGATTGTGGA</u>	60
	<u>A M D W Y N K G Y V T D V K D Q</u> K D C G	
	RT-1 →	
61	TCATGCTGGGCCTTCAGTGCAGTAAGACCCACATTTTGACATTTACAAAGAGGTCTTATA	120
	S C W A F S A V R P T F *	
	RT-1 →	
121	TGGCAATTTTATAGAGTCCATATAGCCCAGGTCAGCATTCCTTAACCTTTTGCATTTATT	180
181	CATCCCTCTTTTGTCTTTTTCAGACTGGTCCCTGGAGGGTCAGACATTCAAGAAGACAGGA	240
241	AAACTGGTGTCTCTGAGTGAACAGCAGCTGGTGGACTGCTCTGGTTCTTATGGGAACATG	300
301	GGCTGTGGTGGAGGACTAATGGACCAGGCCCTTCCAGTACATTGAAGCCAATGGGGGTCTG	360
361	GATACAGAGGAGTCCCTACCCATATGAGGCCACTGTGAGTCTTTATAATGTTTGATTCTTA	420
421	CCGTAATGCTTCAGCTTGTGTTGTTTAAATGATTTTAAATCATTTTTGCTCATCAATTTT	480
481	TTCCCATGCAGGATGGCAAGTGCCGTTTTTAACCCGAGCACTGTAGGTGCCACCTGCACAG	540
541	GATATGTTGATGTGCAGCAGTGGGGATGAAAGTGCACTACAGGAGGCTGTTGCCACAATCG	600
601	GCCCTGTATCTGTTGCCATCGATGCTGGACACAGCAGCTTCCAGCTCTATGAATCAGGTA	660
661	AATGCTATCGCTTGTGTTTTTAGGTGTTAGGTTTTACATGTGAAATTTTATCCATTAATTA	720
721	TTCAGGTTTGAATGAGATATTTGTTGTCTAATGTAATAAATAATGTTTCTAGGTATCTAC	780
781	AATGAACCTGAGTGCAGCAGCTCTGACTTAGATCATGGCGTCTTGGCGGTGGGATA	836

Fig. 44. Nucleotide and deduced amino acid sequences (partial) of RT-PCR product (836 bp) and design of primer for RT-PCR. The stop codon is indicated by gray box and asterisk. N-terminal amino acid sequences of purified carp cathepsin S are boxed. New designed primer sequences are underlined.

プライマーRT-1 と CAL-H を用い次いで RT-2 と CAL-H で semi-nested PCR を行ったところ、約 820 bp に特異的バンドが検出されたため、この増幅断片をクローニングしスク

リーニングを行ったところ、4種類の異なる増幅断片(約 500 bp、620 bp、720 bp、830 bp)があることがわかった。そこでそれらを順に Type I、II、III、IV とし遺伝子解析した(Fig. 45)。ブロック①、②、③、④の各領域は全 Type に含まれていた。しかし挿入配列 a、b、c の有無によって各 Type に分かれることがわかった。これらを模式化したものを Fig. 46 に示した。更にその境界付近を解析してみるとエクソン-イントロン間の保存領域とほぼ一致し、挿入配列 a、b、c の両端には GT/AG が確認されたことにより挿入配列はイントロンであることが確認された。

1	GCCATGGATTGGTACAACAAGGGCTACGTGACTGATGTTAAAGACCAGAAGGATTGTGGA	60	①
61	TCATGCTGGGCCTTCAGTGCAGTAAGACCCACATTTTGACATTTACAAAGAGGTCTTATA	120	
121	TGGCAATTTTATAGAGTCCATATAGCCCAGGTCAGCATTCTTAACCTTTTGCATTTATT	180	a
181	CATCCCTCTTTTGTCTTTCACTGGTTCCCTGGAGGGTCAGACATTCAAGAAGACAGGA	240	
241	AAACTGGTGTCTCTGAGTGAACAGCAGCTGGTGGACTGCTCTGGTTCTTATGGGAACATG	300	②
301	GGCTGTGGTGGAGGACTAATGGACCAGGCCTTCCAGTACATTGAAGCCAATGGGGGTCTG	360	
361	GATACAGAGGAGTCCTACCCATATGAGGCCACTGTGAGTCTTTATAATGTTTGATTCTTA	420	b
421	CCGTAATGCTTCAGCTTGTTGTTGTTTAAATGATTTTAATCATTTTTGCTCATCAATTTT	480	
481	TTCCCATGCAGGATGGCAAGTGCCGTTTTAAACCCGAGCACTGTAGGTGCCACCTGCACAG	540	
541	GATATGTTGATGTCAGCAGTGGGGATGAAAGTGCACTACAGGAGGCTGTTGCCACAATCG	600	③
601	GCCCTGTATCTGTTGCCATCGATGCTGGACACAGCAGCTTCCAGCTCTATGAATCAGGTA	660	
661	AATGCTATCGCTTGTTTTTTAGGTGTTAGGTTTTACATGTGAAATTTATCCATTAATTA	720	c
721	TTCAGGTTTGAATGAGATATTTGTTGTCTAATGTAATAAATAATGTTTCTAGGSTATCTAC	780	④
781	AATGAACCTGAGTGCAGCAGCTCTGACTTAGATCATGGCGTCTTGGCGGTGGGATA	836	

Fig. 45. Nucleotide sequence and separation of RT-PCR product (836 bp). Boxes indicate putative exon of carp cathepsin S. Bold letters indicate exon-intron boundary sequences. Dot lines indicate intron.

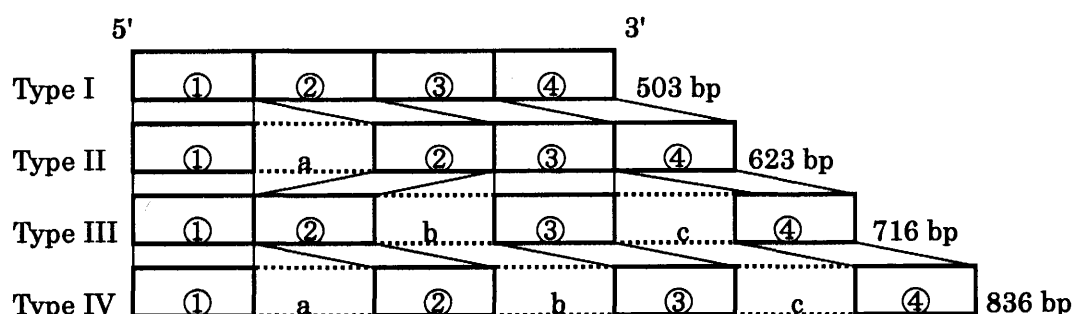


Fig. 46. Scheme of four different types of RT-PCR products. Boxes indicate putative exon of carp cathepsin S. Dot boxes indicate intron.

そこでイントロンの無い Type I の解析をしたところ、ストップコドンの無い ORF であることがわかったため、Type I の配列と初めに RT-PCR にて増幅した断片の 5'末端領域を加えた Type I の全塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した(Fig. 47)。全長は 503 bp からなり 167 アミノ酸配列をコードしていた。また、コイカテプシン S の N 末端アミノ酸配列を持っていたことにより、Type I がコイカテプシン S 遺伝子の一部であると推定した。また第一章で決定したコイカテプシン L と比較すると、活性中心である Cys と His は保存されていたが、カテプシン L に見られる糖鎖結合部位の Asn は見られなかった。このことによりカテプシン L とは別のカテプシンであることがわかった。次に哺乳類のカテプシン S(マウス(Gen Bank accession no. AJ002386)、ラット、⁴⁶⁾ ヒト、⁴⁷⁾ ウシ^{48, 49)}、コイカテプシン L と比較した結果(Fig. 48)、カテプシン L とは明らかに異なるカテプシン S 様のシステインプロテアーゼである事が示唆された。

1	GCCATGGATTGGTACAACAAGGGCTACGTGACTGATGTTAAAGACCAGAAGGATTGTGGA	60
1	A M D W Y N K G Y V T D V K D Q K D C G	20
61	TCATGCTGGGCCTTCAGTGCAACTGGTTCCTGGAGGGTCAGACATTCAAGAAGACAGGA	120
21	S C W A F S A T G S L E G Q T F K K T G	40
121	AAACTGGTGTCTCTGAGTGAACAGCAGCTGGTGGACTGCTCTGGTTCTTATGGGAACATG	180
41	K L V S L S E Q Q L V D C S G S Y G N M	60
181	GGCTGTGGTGGAGGACTAATGGACCAGGCCTTCCAGTACATTGAAGCCAATGGGGGTCTG	240
61	G C G G G L M D Q A F Q Y I E A N G G L	80
241	GATACAGAGGAGTCTACCCATATGAGGCCACTGATGGCAAGTGCCGTTTAAACCCGAGC	300
81	D T E E S Y P Y E A T D G K C R F N P S	100
301	ACTGTAGGTGCCACCTGCACAGGATATGTTGATGTCAGCAGTGGGGATGAAAGTGCACATA	360
101	T V G A T C T G Y V D V S S G D E S A L	120
361	CAGGAGGCTGTTGCCACAATCGGCCCTGTATCTGTTGCCATCGATGCTGGACACAGCAGC	420
121	Q E A V A T I G P V S V A I D A G H S S	140
421	TTCCAGCTCTATGAATCAGGTATCTACAATGAACCTGAGTGCAGCAGCTCTGAATTAGAT	480
141	F Q L Y E S G I Y N E P E C S S S E L D	160
481	CATGGTGTGTTGGCGGTAGGATA	503
161	H G V L A V G	167

Fig. 47. Partial and deduced amino acid sequences from the RT-PCR product Type I of carp cathepsin S?. N-terminal amino acid sequences of purified carp cathepsin S are boxed.

```

Type I      1 AMDWYNKGYVTDVKDQKDCGSCWAFSATGSLEGQTFKKTGKLVSLSEQQLVDCS--GSYG 58
Mouse      116 TV..RE..C..E..Y.GS..A.....V.A....LKL.....I...A.N.....NEEK.. 175
Rat        116 SV..RE..C..N..Y.GS.....E.A....LKL.....A.N.....TEEK.. 175
Human      118 SV..RE..C..E..Y.GS..A.....V.A..A.LKL.....A.N.....T-EK.. 176
Bovine     4 SM..RE..C..E..-GA.....V.A..A.VKL.....A.N.....T-AK.. 61
Carp(Cat.L)119 SL..RE.....P....GE.....T..AM...M.R.....N.....--RPE. 179
          ** ** * * * * * ** * * * * * * * * * * *
Type I      59 NMGCGGGLMDQAFQYIEANGGLDTEESYPYEATDGK-CRFNPSTVGATCTGYVDVSSGDE 117
Mouse      176 .K.....Y.TE.....ID...IEADA....K.M.E.-.HY.SKNRA...SR.IQLPF... 235
Rat        176 .K.....F.TE.....ID-TSI.S.A....K.M.E.-.LYDPKNRA...SR.IELPF... 234
Human      177 .K..N..F.TT.....ID.K.I.SDA....K.M.L.-.QYDSKYRA...SK.TELPY.R. 236
Bovine     62 .K..N..F.TE.....ID.N.I.S.A....K.M...-.QYDVKNRA...SR.IELPF.S. 121
Carp(Cat.L)180 .E..N.....KDQN...S.....VG..DQP.HYD.KYSA.ND..F..IP..K. 238
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Type I      118 SALQEAVATIGPVSVAI-DAGHSSFQLYESGIYNEPECSSSELDHGVVLAVG 167
Mouse      236 D..K....TK.....G.-..S....FF.K..V.DDPS.-TGNVN_...V.. 283
Rat        235 E..K....TK.....G.D..S....F..Q..V.DDPS.-TENMN_...V.. 283
Human      237 DV.K....NK.....GV-.R.P..F..R..V.Y.PS.-TQNVN_...V.. 284
Bovine     122 E..K....NK.....G.-..S....F..KT.V.YDPS.-TQNVN_...V.. 169
Carp(Cat.L)239 H..MK.I.AV.....-....E...F.Q....Y.K....E..... 286
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Fig. 48. Comparison of partial amino acid sequences of Type I, mammalian cathepsin Ss, and carp cathepsin L. Type I; carp cathepsin S?, Carp(Cat.L); carp cathepsin L. Dots mean identical with Type I. Generally conserved sequences within Type I are indicated by asterisks. Actives (Cys, and His) are bold and underlined. N-glycosylation site (Asn) is underlined.

そこで、カテプシン L 様酵素を得る目的で新たにカテプシン群に保存されている活性中心の Cys 近傍(CGSCWAFS)でプライマーCATH-CYS(5'-TGC/TGGA/C/G/TA/WC/GA/C/G/TGC/TTGGGCA/C/G/TTT-3')と、同じく Asn 近傍(WLVNSW)でプライマーCAS-W(5'-CCCCAA/C/G/TC/GA/TA/GTTC/TTTA/C/G/TACA/C/G/TAA/GCCA-3')を作成し、RT-PCR を試みたところ約 500 bp の特異的断片が得られ、クローニング後、塩基配列を決定し解析した結果、約半数のクローンはカテプシン L であった。残りのクローンは Type I(Fig. 49A)と、Type I とは違うがよりカテプシン S に近いもの(CSCCP)(Fig. 49B)、そしてイントロンの入った CSCCP であった。しかし、CSCCP にはカテプシン L 及びカテプシン S に構造的に非常に類似のカテプシン K に見られる糖鎖結合部位が同じ場所に見られた。

(A)		
1	TGTGGATCATGCTGGGCCTTCAGTGCAACTGGTTCCCTGGAGGGTCAGACATTCAAGAAG	60
1	C G S C W A F S A T G S L E G Q T F K K	20
61	ACAGGAAAACCTGGTGTCTCTGAGTGAACAGCAGCTGGTGGACTGCTCTGGTTCTTATGGG	120
21	T G K L V S L S E Q Q L V D C S G S Y G	40
121	AACATGGGCTGTGGTGGAGGACTAATGGACCAGGCCTTCCAGTACATTGAAGCCAATGGG	180
41	N M G C G G G L M D Q A F Q Y I E A N G	60
181	GGTCTGGATACAGAGGAGTCTACCCATATGAGGCCACTGATGGCAAGTGCCGTTTAAAC	240
61	G L D T E E S Y P Y E A T D G K C R F N	80
241	CCGAGCACTGTAGGTGCCACCTGCACAGGATATGTTGATGTCAGCAGTGGGGATGAAAGT	300
81	P S T V G A T C T G Y V D V S S G D E S	100
301	GCACTACAGGAGGCTGTTGCCACAATCGGCCCTGTATCTGTTGCCATCGATGCTGGACAC	360
101	A L Q E A V A T I G P V S V A I D A G H	120
361	AGCAGCTTCCAGCTCTATGAATCAGGTATCTACAATGAACCTGAGTGCAGCAGCTCTGAC	420
121	S S F Q L Y E S G I Y N E P E C S S S D	140
421	TTAGATCATGGTGTCTGGCTGTGCGATATGGAAGTTCAAGTGGAGAGGACTATTGGCTC	480
141	L D H G V L A V G Y G S S S G E D Y W L	160
481	GTGAAGAACTGGTGGGG	497
161	V K N W W	165
(B)		
1	TGTGGGTCATGTTGGGCATTCAGCTCTGTTGGGGCTCTTGAAGGTCAGCTGATGAAGGCC	60
1	C G S C W A F S S V G A L E G Q L M K A	20
61	ACCGGAAAGCTGGTGCACCTCAGTCCTCAGAATCTGGTGGACTGTTCTCCAGTTACGGC	120
21	T G K L V D L S P Q N L V D C S S S Y G	40
121	AACAAGGGCTGCAATGGCGGTTTTATGAGTTCTGCTTTCAGTATGTCATTGATAATGGA	180
41	N K G C N G G F M S S A F Q Y V I D N G	60
181	GGAATAGACTCAGAGTCATCTTACCCTTATGAAGGAGTGCAAGGGCAGTGCAGATACAAT	240
61	G I D S E S S Y P Y E G V Q G Q C R Y <u>N</u>	80
241	CCATCCCAGCACGCAGCCAACCTGCACAAAGTACTATTTTCGTCTCTCAGGGAGATGAAGAA	300
81	P S Q H A A <u>N</u> C T K Y Y F V S Q G D E E	100
301	GCCCTGAAGCAGGCTTTGGCCAGTGTGGGCCCATTTTCAGTGGCCATTGATGCCACCCGC	360
101	A L K Q A L A S V G P I S V A I D A T R	120
361	CCTCAGTTTATCCTGTACCGCAGTGGAGTTTACAATGACCCAACCTGTACAAAAAAGTA	420
121	P Q F I L Y R S G V Y N D P T C T K K V	141
421	AACCATGCAGTGTCTGGCTGTGGGATATGGTGCGACTGCTGGACAGGACTTTTGGCTGGTC	480
141	N H A V L A V G Y G A T A G Q D F W L V	160
481	AAAAACAGTTGGGG	494
161	K N S W	164

Fig. 49. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Type I and CSCCP from RT-PCR (about 500 bp). (A), Type I. (B), CSCCP. N-glycosylation sites (Asn) are underlined.

考察と小括

考察

本研究ではカテプシン L のアイソフォームの有無を確認するために、カテプシン L 様酵素並びに酵素学的にも一次構造レベルでも非常に類似のカテプシン S の遺伝子クローニングを行った。

Pangkey らの報告⁴⁴⁾では、精製酵素での分子量は約 37 kDa で、ウシの精製酵素での分子量(約 24 kDa)と比較してかなり大きいと報告している。この様な報告はカテプシン群ではなく非常に興味を持たれる。この情報を元に当初 3'-RACE 法を用いて、一度に成熟型酵素の一次構造を得ようと考えたが、目的のクローンは得られなかった。全 RNA より c DNA の合成を行ったが、mRNA は全 RNA の 1% もなく、mRNA 由来ではない tRNA などの c DNA も合成され、鋳型となる一本鎖 c DNA に不純物が多数含まれていると考えた。また、精製酵素の結果や、マウスでの肝臓における mRNA の発現レベルでの比較により、カテプシン L に比べて mRNA 量が少ないことより、³¹⁾より純粋な mRNA 由来一本鎖 c DNA を作成し使用したほうが良いと判断し、mRNA を精製してから一本鎖 c DNA を合成し、以後の実験に用いた。

RT-PCR では精製酵素の分子量が哺乳類のものとは比べて大きいということを裏付けるようなクローン(Type IV)が得られたが、この配列のには3つのイントロンが含まれており(Fig. 46)、完全な mRNA では無くスプライシングされる前の heterogeneous nuclear (hn)RNA であることがわかった。更に面白いことにスプライシング段階の hnRNA(Type II, Type III)も確認された(Fig. 46)。通常スプライシングは速やかに行われ⁵⁰⁾ hnRNA 由来の mRNA が得られることはほとんど無い。また、カテプシン L ではこの様なクローンは得られない。なぜこの様なスプライシング段階のクローンが存在するのか明らかとするためには、EST クローンを作成し解析するしかないが、本研究の本筋から外れるため、諦めた。

Type I はカテプシン L の特徴の一つである成熟型酵素内の糖鎖結合部位が無かったため、更に今度は活性中心間でのプライマーを作成し RT-PCR 法を行い解析を進めた(Fig. 49)。その結果、カテプシン L 様酵素は得られず、約半数のクローンはカテプシン L で Type I とは異なるが、カテプシン S と割と相同性の高いクローン CSCCP も得られた。CSCCP はデータベース上にあるコイ卵巣よりクローニングした Cysteine proteinase(CCP)(GenBank accession no. L30111)と非常に高い相同性を示した。そこで、第一章と同じ方法で RACE 法にて両クローンの全塩基配列の決定を試みた。なお、第一章で述べた 5'RACE 法におけるアニーリング温度の問題を解決するため、プライマー OL-dT を用いる代わりに、first PCR 時に c DNA 合成時に使用した CDS-BR プライマーを使い、nested PCR(semi-nested PCR)にアンカープライマーである APS-BR プライマーを用いて行ったところ、アニーリング温度をかなり上げることができ、この方法はかなり有効である事がわかった。以後、5'RACE

にはこの方法で行ったほうが反応条件などをさほど気にすることなくその他の遺伝子クローニングにも有効であると思われる。

Type I においては、約 1200 bp の全長クローンが得られたが、N 末端アミノ酸配列の前半部分に精製酵素とは違うアミノ酸で構成されていた。また CSCCP では 5'RACE 法ではクローンが得られず、いまだ解析中である。いずれにしても、Type I は成熟型酵素のアミノ酸配列と違いが見られ、CSCCP においてはカテプシン L 及びカテプシン K に保存されている糖鎖結合部位が見られたことにより、両クローンともにコイカテプシン L ではなくカテプシン S 様酵素であると結論付けた。本研究ではカテプシン S 様酵素は得られたが、カテプシン L 用酵素は得られず、コイカテプシン L にアイソフォームは存在しない事が確認された。つまり、コイカテプシン L 遺伝子はシングルコピー遺伝子である可能性が高い。

小括

1. 遺伝子クローニングの結果、2 タイプのカテプシン S 様酵素が得られた。
2. 両タイプともに前駆体 mRNA が得られた。
3. コイカテプシン L 遺伝子にはアイソフォームは存在しない事が確認された。

総括

本研究は、細胞内タンパク質分解の中心的役割を担い、死後は魚肉の軟化現象に深く関与しているとされているが、あまり研究の進んでいない魚類カテプシン L の全一次構造を決定し、分子構造、及び生理的な機能を明らかにするのに必要な基礎的な知見を得ることを目的として行った。

第一章「コイ肝臓カテプシン L 遺伝子のクローニング」では、RT-PCR、RACE 法で遺伝子クローニングを行い、その全一次構造を決定した。本酵素は 337 アミノ酸から構成されており、推定分子量は不活性前駆体酵素では約 38.5 kDa で、成熟型酵素では 24.4 kDa であった。コイカテプシン L は糖鎖を含んでいることが確認されており、^{15,44)} 精製酵素の分子量(28-29 kDa)より小さいのは糖鎖の分子量が含まれていないためである。また、精製酵素の N 末端アミノ酸配列が塩基配列から推定したアミノ酸配列と完全に一致したことにより、本遺伝子がコイカテプシン L 遺伝子であることが確認された。

第二章「コイカテプシン L と他起源由来カテプシン L との比較生化学的研究」では、第一章で決定したコイカテプシン L の全一次構造と他起源由来カテプシン L とを比較生化学的に解析した。ニジマスカテプシン L とは約 83% の相同性を示し、哺乳類カテプシン L とは約 62~69% の相同性を示した。また、活性中心の Cys、His、Asn 及び糖鎖結合推定部位の Asn も既知のカテプシン L と同じ位置に保存されていた。また、カテプシン L には 3 つの S-S 結合(Cys¹³⁵ と Cys¹⁷⁸ (Human numbers)、Cys¹⁶⁹ と Cys²¹¹、及び Cys²⁶⁹ と Cys³²²)が存在することが知られている ⁵¹⁾ が、それらの存在も確認された。哺乳類カテプシン L は Fig.26 に示す通り、リボソーム上で合成されたのち小胞体内へ輸送され、プレ部がシグナルペプチダーゼによってプロセッシングを受け、プロ型の不活性前駆体酵素となると同時に糖鎖が付加される。^{1,2)} その後ゴルジ体へ移行し、糖鎖の修飾を受けた後、エンドソームへ輸送される。エンドソームがリソソームへ変化する過程で自己分解 ²⁰⁾ あるいはメタロエンドペプチダーゼ ⁸⁾ によってプロ部がプロセッシングを受け、成熟型酵素となる。⁸⁾ 更に、システインプロテアーゼによって速やかに single-chain form (29 kDa) から重鎖 (23 kDa) と軽鎖 (6 kDa) が S-S 結合(Cys²⁶⁹ and Cys³²²)でつながった two-chain form へとプロセッシングされ、安定な成熟型酵素へと変化する。^{1,3,8,21)} しかし、魚類においては、精製酵素から two-chain form を取らないことを示唆するデータが得られており、¹⁵⁾ 哺乳類カテプシン L で重鎖と軽鎖にプロセッシングされる部位近傍のアミノ酸配列を解析した (Fig. 29)。その結果、プロセッシング部位の前後 3 残基は、魚類間、あるいは哺乳類間でそれぞれ保存されていた。プロセッシング部位は哺乳類では Ser²⁹⁰-Asn²⁹¹ であるのに対して魚類では Val²⁹⁴-Asp²⁹⁵ になっており、その P1 部位のアミノ酸が哺乳類では親水性アミノ酸の Ser であるのに対して、魚類カテプシン L は疎水性アミノ酸の Val であった。その

プロセッシングはシステインプロテアーゼによって行われると言われているが、魚類カテプシン L において P1 部位に疎水性アミノ酸である Val を持つペプチドを加水分解するという報告は無い。更に、報告のあるマイワシ(GenBank accession no. AB081845)の全一次構造及び、ハゼの一種(Long-jawed mudsucker *Gillichthys mirabilis*)⁵²⁾ の部分配列においても Val であった。また、アフリカツメガエル (GenBank Accession No. Y 15901.) でも同様に Val であった。しかしニワトリカテプシン L は精製酵素の SDS-PAGE により、two-chain form を取ることがわかっている。²⁴⁾ シロサケカテプシン L では精製酵素の SDS-PAGE により、single-chain form であることがわかっている¹²⁾。進化の過程においてどの段階で two-chain form を取るようになったのかわからないが、少なくとも魚類カテプシン L は two-chain form を取らないことが一次構造からも示唆された。このような現象はその他のプロテアーゼでも報告されており、同じシステインプロテアーゼに属するカテプシン B も、哺乳類カテプシン B は two-chain form を取る^{7, 8)} が、Yamashita らの報告によればシロサケカテプシン B(EC 3.4.22.1)も SDS-PAGE において single-chain form であることが確認されている。⁵³⁾ セリンプロテアーゼに属するキモトリプシン(EC 3.4.21.1)においても、哺乳類においては、A、B、C の各鎖にプロセッシングされることが知られている。⁵⁴⁾ しかし魚類においては、コイキモトリプシン、⁵⁵⁾ 大西洋ダラ(Atlantic cod *Gadus morhua* L.)キモトリプシン⁵⁶⁾ においても、精製酵素の SDS-PAGE にのデータにより、B 鎖と C 鎖にプロセッシングされないことが報告されている。これらは全てプロテアーゼであるが、プロテアーゼの活性化機構は哺乳類のものとは異なる可能性が強く示唆された。

第三章「コイカテプシン L の大量発現系の構築に関する研究」では、第一章で得られたコイカテプシン L 遺伝子の完全長 cDNA を用い、遺伝子組換え技術による大腸菌内の大量発現系の構築を行い、得られた発現酵素について若干の知見を得た。発現酵素では自己触媒的活性化によりまだ不完全ではあるが、成熟型酵素を得る事ができ、活性化後 24 時間でも single-chain form のままであることがわかった。Hara、⁸⁾ Kominami⁹⁾ らの報告によれば哺乳類においてパルスチェイス法により、成熟型カテプシン L は自身によって速やかにプロセッシングを受け活性化後 3 時間で two-chain form を取ることが知られている。このことから、発現酵素からもコイカテプシン L は two-chain form を取らないことが示唆された。また、酵素学的諸性質は成熟型酵素とほぼ同じ性状を示した事により、本発現酵素はコイカテプシン L であることが裏付けられた。

第二章の知見と総合すると、次のようなことが示唆される。つまり、哺乳類カテプシン L は two-chain form を取るが、魚類カテプシン L は two-chain form を取らないという仮説である(Fig. 50)。この事は、哺乳類と魚類カテプシン L との大きな違いであり、進化学的にも非常に興味を持たれる。

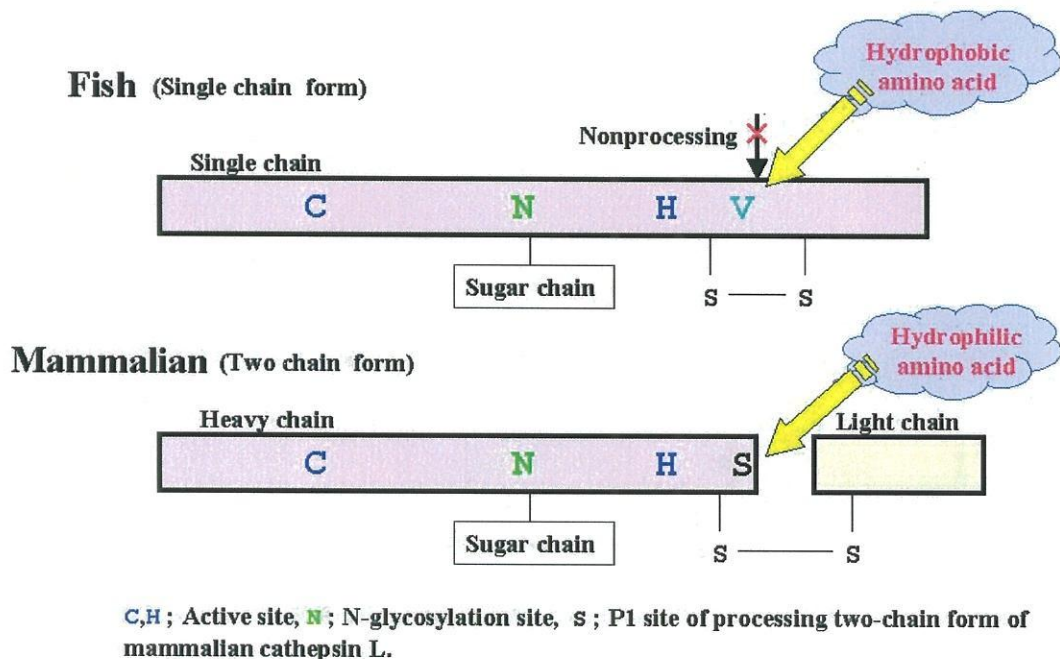


Fig. 50. Schematic representation of potential structure of mature cathepsin L.

第四章「コイカテプシン L の発現分布及びゲノム DNA の構造からの研究」ではノーザンハイブリダイゼーション法による mRNA の組織分布及びコイカテプシン L の遺伝子構造について研究した。ノーザンハイブリダイゼーション法では、様々な組織で mRNA の発現が確認され、生殖器＞肝臓＞腸＞その他の組織の順に高い発現量を示した。特に生殖器に高い mRNA の発現が見られたが、用いたコイの生殖器が未成熟段階であったため、生殖器の成熟に関与している可能性が示唆された。それ以外は哺乳類カテプシン L mRNA の発現レベルとそれ程の違いはみられなかった。従って生理的機能においてもさほど違いは無いものと思われる。また、各組織の酵素タンパク量と相関が見られたことによりカテプシン L はタンパク合成後速やかに活性化されることが予想された。コイカテプシン L の ORF の遺伝子構造については、イントロン 4 が欠損している以外、ヒトカテプシン L 遺伝子とイントロンの位置は全く同じであった。このことにより、ヒトとコイカテプシン L 遺伝子は元は同じ祖先を持つ遺伝子であった事が推察された。しかし、イントロンサイズの違いにより、コイカテプシン L 遺伝子の全長は、ヒトの約半分であった (Fig. 42)。コイのゲノムサイズはヒトよりかなり短いのかもしれない。また、コイの捕体遺伝子には多重化が起きているという報告があるが³⁷⁾、今のところコイカテプシン L 遺伝子にはそのようなデータは

得られていない。イントロン 4 の欠損に関しては、マイワシでは少なくとも存在している事がわかっている。しかし、それ以外の知見は無く、もしかしてコイ科に特有のものかもしれない。また、ショウジョウバエでも同様の報告があることにより、³⁶⁾ 元のオリジナルカテプシン L には存在しなかった可能性があるが、あくまで推測に過ぎない。カテプシン L 遺伝子のデータが蓄積されれば、徐々に明らかとされていくであろう。今回の研究では、イントロン 1 より上流、つまりエクソン 1 と転写調節領域のプロモーター領域は得られていない。哺乳類ではプロモーター領域の知見が得つつあるが、⁵⁷⁻⁶⁰⁾ 魚類カテプシン L ではいまだ報告が無い。カテプシン L の生理的な役割を理解する上で重要な領域であり、今後の課題である。

第五章「カテプシン L 様酵素の遺伝子クローニング」ではコイカテプシン L 様酵素及び酵素学的諸性質が類似のカテプシン S 遺伝子のクローニングを試みた。RT-PCR 法によりカテプシン L 様酵素は増幅されず、2 タイプのカテプシン S 様酵素の遺伝子とカテプシン L 遺伝子が得られたが、カテプシン S と断定するには至らず、コイカテプシン L 遺伝子にアイソフォームは存在しない事が示唆された。

以上の結果から、コイカテプシン L は酵素学的にも生理的な役割も哺乳類のものと類似である可能性がある。本研究は魚類カテプシン L を研究する上での基礎となり、魚類カテプシン群の生理的役割を理解するのに貢献するものと考えている。

謝辞

本研究は長崎大学水産学部原研治教授ならびに石原忠教授のご指導、ご鞭撻の下に行われたもので、ここに厚くお礼申し上げます。細部にわたり直接ご指導賜った長崎大学水産学部長富潔助教授に深謝する。また、本論文を作成するにあたり、数々の貴重なご助言を頂戴した長崎大学水産学部橘勝康教授に心よりお礼申し上げます。

mRNA の組織分布を解析するにあたり、ご協力並びにご指導頂いた環境科学部の長江真樹助教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり分析機器の提供ならびにご助言を頂いた長崎大学水産学部小田達也教授、野崎征宜教授ならびに山口健一助教授に心から感謝する。

本研究を進めるにあたり、長崎大学水産学部海洋生物化学研究室各位に常にご協力を賜った。ここに記して感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 勝沼 信彦. 細胞内タンパク質分解<機構、調節、病態>細胞内システインプロテアーゼ群. 東京化学同人, 東京. 1992: pp. 35-50.
- 2) 勝沼 信彦. リソゾーム・プロテアーゼの機能と調節. 最新医学 1998; 43 (4): 720-724.
- 3) Barrett AJ, Kirschke H. *Cathepsin B, Cathepsin H and, Cathepsin L, in "Meth.Enzymol"(ed. Laszio Lorand). Vol.80, Academic press, New York / London / Paris / San Diego / Sao Paulo / Sydney / Tokyo / Toronto , 1981: 535-561.*
- 4) Bando Y, Kominami E, Katunuma N. Purification tissue distribution of rat cathepsin L. *J.Biochem.* 1986; 100: 35-42.
- 5) Ishidoh K, Katunuma N, Suzuki K. Molecular cloning and sequencing of cDNA for rat cathepsin L. *FEBS Lett.* 1987; 223: 69-73.
- 6) Chauhan SS, Popescu NC, Ray D, Fleischman R, Gottesman MM, Troen BR. Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of human cathepsin L. *J. Biol. chem.* 1993; 268: 1039-1045.
- 7) Kominami E, Tsukahara T, Hara K, Katunuma N. Biosynthesis and processing of lysosomal cycteine proteinases in rat macrophages. *FEBS Lett.* 1988; 231: 225-228.
- 8) Hara K, Kominami E, Katunuma N. Effect of proteinase inhibitors on intercellular processing of cathepsin B, H and L in rat macrophages. *FEBS Lett.* 1988; 231: 229-231.
- 9) Villadangos JA, Ploegh HL. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in change?. *Immunity* 2000; 12: 233-239.
- 10) Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., Rudensky, A.Y. 1998. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T Cell selection in the thymus. *Science* 280, 450-453.
- 11) Aranishi F, Ogata H, Hara K, Osatomi K, Ishihara T. Purification and characterization of cathepsin L from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; 118B: 531-537.
- 12) Yamashita M, Konagaya S. Purification and characterization of cathepsin L from the white muscle of chum salmon, *oncorynchus keta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1990; 96: 247-252.
- 13) 植本 六秀. コイ腹腔マクロファージのカテプシン B,L に関する研究. 修士論文, 長崎大学大学院水産学研究科, 長崎, 1995.

- 14) Aranishi F, Hara K, Osatomi K, Ishihara T. Cathepsins B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of Carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; 117B: 605-611.
- 15) 土井 孝史. コイ Cathepsin L のモノクローナル抗体の作成. 修士論文, 長崎大学大学院水学研究科, 長崎, 1994.
- 16) 益富 繁. コイ腹腔マクロファージカテプシン L 遺伝子のクローニング. 修士論文, 長崎大学大学院水産学研究科, 長崎, 1999.
- 17) Vogel AM, Gerster T. Expression of a zebrafish cathepsin L gene in anterior mesendoderm and hatching gland. *Dev. Genes. Evol.* 1997; 206: 477-479.
- 18) Kwon JY, Prat, Randall C, and Tyler CR. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 2001; 65: 1701-1709.
- 19) Portnoy DA, Erickson AH, Kochan J, Ravetch JV, Unkeless JC. Cloning and characterization of mouse cysteine proteinase. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 14697-14703.
- 20) Ogata H, Aranishi F, Hara K, Osatomi K, Ishihara T. Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L. *J. Sci. Food. Agric.* 1988; 76: 499-504.
- 21) Ishidoh K, Saido TC, Kawashima S, Hirose, Watanabe S, Sato N, Kominami E. Multiple processing of procathepsin L to cathepsin L *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 252: 202-207.
- 22) Hopp TP, and Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981; 78: 3824-3828.
- 23) von Heijne G. Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* 1985; 184: 99-105.
- 24) Wada K, Tanabe T. N-terminal amino acid sequences of the heavy and light chains of chicken liver cathepsin L. *FEBS Lett.* 1986; 209 (2): 330-334.
- 25) Lemon-Duménil AM, Roberts RA, Valentijn K, Driessen C, Overkleeft HS, Erickson A, Deters PJ, Bikoff E, Ploegh HL, Bryant PW. The p41 isoform of invariant chain in a chaperone for cathepsin L. *EMBO J.* 2001; 20: 4055-4064.
- 26) Yoder JA, Haire RN, Litman QW. Cloning of two zebrafish cDNAs that share domains with the MHC class II-associated invariant chain. *Immunogenetics* 1999; 50: 84-88.
- 27) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- 28) Dolinar M, Maganja DB, and Turk V. Expression of full-length human

- procathepsin L cDNA in *Escherichia coli* and refolding of the expression product. *Biol. Hoppe-Seyler* 1995; **376**: 385-388.
- 29) Ogino T, Kaji T, Kawabata M, Satoh K, Tomoo K, Ishida T, Yamazaki H, Ishidoh K, Kominami E. Function of the propeptide region in recombinant expression of active procathepsin L in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 1999; **126**: 78-83.
 - 30) 竹内拓司. 大羽滋. 遺伝子の生物学－ライフサイエンスの基礎. 朝倉書店, 東京. 1986: pp. 79-80.
 - 31) Söderström M, salminen H, Glumoff V, Kirschke H, Aro H, Vuorio E. Cathepsin expression during skeletal development. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; **1446**: 35-46.
 - 32) Sol-Church K, Frenck J, Mason RW. Mouse cathepsin M, a placenta-specific lysosomal cysteine protease related to cathepsins L and P. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; **1491**: 289-294.
 - 33) Sol-Church K, Frenck J, Mason RW. Cathepsin Q, a novel lysosomal cysteine protease highly expressed in placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; **267**: 791-795.
 - 34) Sol-Church K, Frenck J, Bertenshaw G, Mason RW. Characterization of mouse cathepsin R, a new member of family of placentally expressed cysteine proteases. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; **1492**: 488-492.
 - 35) Troen BR, Gal S, Gottesman MM. Sequence and expression of the cDNA for MEP (major expressed protein), a transformation-regulated secreted cathepsin. *Biochem. J.* 1987; **246**: 731-735.
 - 36) Gray YH, Sved JA, Preston CR, Engels WR. Structure and associated mutational effects of the cysteine proteinase (CP1) gene of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 1998; **7**: 291-293.
 - 37) Nakao M, Matsumoto M, Nakazawa M, Fujiki K, Yano T. Diversity of complement factor B/C2 in the common carp (*Cyprinus carpio*): Three isotypes of B/C2-A expressed in different tissues. *Dev. Comp. Immunol.* 2002; **26**: 533-541.
 - 38) Gerb BD, Shi GP, Heller M, Weremowicz S, Morton C, Desnick RJ, Chapman HA. Structure and chromosomal assignment of the human cathepsin K gene. *Biochem. Mol. Med.* 1996; **59**: 200-206.
 - 39) Rood JA, Van Horn S, Drake FH, Gowen M, Debouck C. Genomic organization and chromosome localization of the human cathepsin K gene (CTSK). *Gemonics* 1997; **41**: 258-262.
 - 40) Li Y-P, Chen W. Characterization of mouse cathepsin K gene, the gene promoter, and the gene expression. *J. Bone Mine. Res.* 1999; **14**: 487-499.

- 41) Kirschke H, Wiederanders B, Bromme D, Rinne A. Cathepsin S from bovine spleen: purification, distribution, intracellular localization and action proteins. *Biochem. J.* 1989; **264**: 467-473.
- 42) Nakagawa TY, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J, McNeish JD, Eastman SE, Howard ED, Clarke SR, Rosloniec EF, Elliott EA, Rudensky AY. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 1999; **10**: 207-217.
- 43) Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 1996; **4**: 357-366.
- 44) Pangkey H, Hara K, Tachibana K, Cao M-J, Osatomi K, Ishihara T. Purification and characterization of cathepsin S from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Sci.* 2000; **66**: 1130-1137.
- 45) Pangkey H, Hara K, Tachibana K, Cao M-J, Osatomi K, Ishihara T. Substrate specificity of carp hepatopancreatic cathepsin S for peptides and myofibrillar proteins. *Fisheries Sci.* 2000; **66**: 1138-1143.
- 46) Patanceska S, Devi L. Sequence analysis, tissue distribution, and expression of rat cathepsin S. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 26038-26043.
- 47) Wiederanders B, Bromme D, Kirschke H, von Figura K, Schmidt B, Peters C. Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 13708-13713.
- 48) Ritonja A, Colic A, Dolenc I, Ogrinc T, Podobnik M, Turk V. The complete amino acid sequence of bovine cathepsin S and partial sequence of bovine cathepsin L. *Eur. Biochem.* 1991; **283**: 329-331.
- 49) Wiederanders B, Bromme D, Kirschke H, Kalkkinen N, Rinne A, Paquette T, Toothman P. Primary structure of bovine cathepsin S: Comparison to cathepsins L, H, B and papain. *FEBS Lett.* 1991; **286**: 189-192.
- 50) J. F. クロー. クロー遺伝学概説 (原書第 8 版) (木村資生, 大田朋子共訳) 培風館, 東京, 1991; 139.
- 51) Michel A, Ghoneim H, Resto M, Klinkert MQ, Kunz W. Sequence, characterization and localization of a cysteine proteinase cathepsin L in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995; **73**: 7-18.
- 52) Gracey AY, Troll JV, Somero GN. Hypoxia-induced gene expression profiling in euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; **98**: 1993-1998.

- 53) Yamashita M, Konagaya S. Purification and characterization of cathepsin B from the white muscle of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1990; **96B**: 733-737.
- 54) Desnuelle P. In: *The Enzymes (2nd edn.)* 4, Academic Press, New York, 1960: 93-118.
- 55) 鈴木美穂. コイ肝臓中のキモトリプシン及びトリプシンに関する研究. 修士論文, 長崎大学大学院水産学研究科, 長崎, 2002.
- 56) Raae AJ, Walther BT. Purification and characterization of chymotrypsin, trypsin and elastase like proteinases from cod (*Gadus morhua* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 1989; **93B**: 317-324.
- 57) Ishidoh K, Kominami E, Suzuki K, Katunuma N. Gene structure and 5'-upstream sequence of rat cathepsin L. *FEBS Lett.* 1989; **259**: 71-4.
- 58) Ishidoh K, Suzuki K, Katunuma N, Kominami E. Gene structures of rat cathepsins H and L. *Biomed. Biochim. Acta.* 1991; **50**: 541-7.
- 59) Bakhshi R, Goel A, Seth P, Chhikara P, Chauhan SS. Cloning and characterization of human cathepsin L promoter. *Gene* 2001; **275**: 93-101.
- 60) Jean D, Guillaume N, Frade R. Characterization of human cathepsin L promoter and identification of binding sites for NF-Y, Sp1 and Sp3 that are essential for its activity. *Biochem. J.* 2002; **361**: 173-84.